UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1936-1937 N° 3

Utilisation de la Cellule Photoélectrique dans l'examen du Sang

1° *Séro-diagnostic de la syphilis par mesure de vitesses d'hémolyse*

2° *Micro-dosage des principaux constituants chimiques du sang.*

THÈSE

présentée et soutenue publiquement

le Juillet 1937

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE DIPLOME SUPÉRIEUR DE PHARMACIEN

PAR

CHARLES POLLÈS

Pharmacien de la Faculté de Strasbourg
Ex-Préparateur des cours à l'Ecole de Plein Exercice de Médecine et de Pharmacie de Nantes

Examinateurs de la Thèse { MM. A. SARTORY, Professeur, Président
Ch. LAPP, Professeur
Y. VOLMAR, Professeur } Juges

IMPRIMERIE DE BRETAGNE
32, RUE DE LA FOSSE
NANTES

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1936-1937 N° 3

Utilisation de la Cellule Photoélectrique dans l'examen du Sang

1° *Séro-diagnostic de la syphilis par mesure de vitesses d'hémolyse*
2° *Micro-dosage des principaux constituants chimiques du sang.*

THÈSE

présentée et soutenue publiquement
le Juillet 1937

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE DIPLOME SUPÉRIEUR DE PHARMACIEN

PAR

CHARLES POLLÈS

Pharmacien de la Faculté de Strasbourg
Ex-Préparateur des cours à l'Ecole de Plein Exercice
de Médecine et de Pharmacie de Nantes

Examinateurs de la Thèse { MM. A. SARTORY, Professeur, Président
Ch. LAPP, Professeur
Y. VOLMAR, Professeur } Juges

IMPRIMERIE DE BRETAGNE
32, RUE DE LA FOSSE
NANTES

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. A. SARTORY, *Doyen*, C. ✻, I. ✪, C. ❁
VOLMAR, *Assesseur*, ✪
CUVIER, *Secrétaire*, A. ✪

DOYEN HONORAIRE

M. Jadin, O. ✻, I. ✪, ❁

PROFESSEURS

MM.	A. SARTORY, C. ✻, I. ✪, C. ❁	Bactériologie
	LAVIALLE, ✻, I. ✪, ❁	Botanique
	VOLMAR, I. ✪	Chimie organique
	GUILLAUME, ✻, ⚷, I. ✪, ❁	Pharmacie galénique
	LAPP, I. ✪	Chimie analytique
	(CORDIER, chargé de cours) ✪	Pharmacie chimique
	(R. SARTORY, chargé de cours) ✪	Matière médicale

PROFESSEUR HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✪, ❁

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.	A. SARTORY	Hygiène
	LAVIALLE	Hydrologie
	VOLMAR	Chimie minérale
	GULLAUME	Zoologie
	LAPP	Physique
	EISENMANN	Législation et Déontologie
	CORDIER	Chimie biologique
	R. SARTORY	Cryptogamie
	DUQUENOIS	Toxicologie

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	R. SARTORY	Bactériolog. et Parasitologie
	COLLARD, I. ✪, ⚷	Chimie pharmaceutique
	BOHN, A. ✪	Histoire naturelle
	DUQUENOIS	Chimie et Physique

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548007_0002

DA

VA ZAD HA VA MANN

GANT ANAOUDEGEZ DIVENT

A Monsieur le Professeur A. SARTORY

Commandeur de la Légion d'Honneur

Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg

Professeur de Bactériologie en cette Faculté

Qui nous a fait le double honneur de nous recevoir dans son laboratoire pour la préparation de notre diplôme et d'accepter la présidence de cette thèse.

En témoignage respectueux de notre grande reconnaissance.

Aux Membres de notre Jury de Thèse :

Monsieur le Professeur Y. VOLMAR

Monsieur le Professeur Ch. LAPP

A Monsieur J. MEYER

Assistant de Bactériologie

à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

En hommage de profonde gratitude.

A Messieurs les Professeurs Ed. LASAUSSE - Dr Y. BUREAU

Professeurs à l'Ecole de Plein Exercice de Médecine et de Pharmacie de Nantes

A qui nous devons d'avoir pu mener à bien ce travail.

En témoignage de notre profonde reconnaissance et de notre respectueux attachement.

A nos Maîtres de l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Nantes

Messieurs les Professeurs :

F. MARGUERY
Al. LABBE
M. DUPONT
B. BALLET
B. GUERITHAULT
Ed. GUEGUEN
J.-B. VEILLON

En hommage reconnaissant.

AVANT-PROPOS

Le travail que nous présentons a été exécuté au laboratoire d'Hygiène de la Ville de Nantes, sous la direction de Monsieur le Professeur LASAUSSE, chef de ce laboratoire.

Nous sommes heureux d'exprimer ici nos remerciements à Monsieur PAGEOT, Député-Maire de Nantes, qui a bien voulu nous autoriser à profiter des ressources du Laboratoire Municipal d'Hygiène ; à Mademoiselle le Docteur DUDEVANT, Directrice du Service Municipal d'Hygiène qui nous a fait dans son service le meilleur accueil, et à tout le personnel du laboratoire d'Hygiène, si complaisant à notre égard.

Le travail entrepris n'a pu être mené à bien que grâce à l'amabilité de Monsieur le Professeur Y. BUREAU, Chef de la Clinique Dermatologique de l'Hôtel-Dieu de Nantes, qui nous ouvrit grand ses services. Tous ses collaborateurs nous y firent comme leur maître un accueil empressé. Nous prions le Docteur BUREAU de trouver ici, ainsi que ses internes et externes, les religieuses de ses services, le témoignage de notre profonde reconnaissance.

Nous sommes d'autant plus sensible aux procédés bienveillants dont nous avons recueilli les bienfaits dans ces services, qu'à l'Hôpital de Nantes il n'est guère d'usage que les services pharmaceutiques pénètrent les services médicaux. C'est là un fait bien regrettable, pour les premiers certainement, pour les seconds peut-être aussi. Nous sommes convaincu, par notre expérience, que le pharmacien aurait tout à gagner à se laisser pénétrer par le grand souffle de vie, par l'activité, qui animent certains services hospitaliers tel que celui où pour notre chance nous avons pu recueillir les éléments nécessaires à notre travail.

Le pharmacien y sentirait le réconfort précieux du travail en équipe qui s'y fait et tous les bienfaits d'une solidarité qui fait le prix de la vie scientifique.

Il est possible, qu'en échange de ces avantages inestimables, la formation que lui donne la constante pratique du laboratoire, lui permette de donner quelque chose à ces services dont il recevrait tant.

*
**

Nous aimons à dire aussi à Monsieur le Docteur G. RAPPIN, Professeur Honoraire de l'Ecole de Médecine de Nantes, Directeur de l'Institut Pasteur de la Loire-Inférieure, notre reconnaissance pour l'amabilité avec laquelle il nous a ouvert ses laboratoires et sa bibliothèque.

*
**

Au début de ce travail, c'est un devoir de reconnaissance bien agréable pour nous de remercier notre maître, Monsieur le Professeur Ed. LASAUSSE, Professeur de Chimie Biologique à l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Nantes, de l'intérêt qu'il nous porte depuis plusieurs années, et des conseils et directives qu'il n'a cessé de nous prodiguer, tant durant les années où nous avons eu l'honneur d'être son préparateur que durant la mise au point de ce travail dont nous lui devons le sujet. Nos remerciements vont aussi à son préparateur, Monsieur L. FROCRAIN, qui nous a si cordialement aidé à résoudre les difficultés qui se présentèrent dans ce travail ; il trouvera ici le témoignage de notre amitié.

*
**

Notre travail comporte deux parties bien distinctes :

— une première partie, bactériologique, ayant trait au diagnostic sérologique de la syphilis ;

— une deuxième partie, chimique, traitant du micro-dosage des principaux constituants du sang.

Première Partie

Utilisation de la Cellule photo-électrique dans le séro-diagnostic de la Syphilis

---

PREMIÈRE PARTIE

UTILISATION DE LA CELLULE PHOTO-ÉLECTRIQUE DANS LE SÉRO-DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS PAR MESURE DE VITESSES D'HÉMOLYSE

PLAN

1) Introduction.
2) Du néphélocolorimètre à cellule photo-électrique employé dans nos essais.
3) Rappel de conceptions théoriques relatives à l'épreuve de B. W.
4) Essais préliminaires.
5) Choix des méthodes analytiques de comparaison.
6) Etablissement de la méthode.
7) Montage de la méthode.
8) Résultats de la méthode.
9) Etude critique.
   a) Exactitude.
   b) Seuil de positivité.
   c) Sensibilité.
   d) Mesure de l'hyperpositivité.
   e) Fidélité.
10) Etude des constituants de la réaction :
   a) Complément.
   b) Sérum humain.
   c) Antigène.
   d) Eau physiologique.
   e) Globules de mouton.
   f) Sérum hémolytique.
11) Contribution à l'établissement d'un micro-sérodiagnostic de la syphilis.
   a) Sérum frais.
   b) Sérum inactivé.
12) Conclusion.
13) Bibliographie.

DE QUELQUES ABREVIATIONS EMPLOYEES DANS CE TRAVAIL

B.W.	Bordet-Wassermann.
S.H.	Sérum Hémolytique.
Cpl.	Complément.
E.P.	Eau physiologique.
R.	Méthode de Rubinstein.
J.	Méthode de Jacobsthal.
C.M.	Méthode de Calmette et Massol.
K.	Méthode de Kahn Standard.
V.	Méthode de Vernes.
[.....]	Signifie qu'il s'agit d'une concentration.

I. — INTRODUCTION

En Avril 1936, Monsieur LASAUSSE faisait avec Monsieur FROCRAIN une communication au Congrès de Pathologie comparée d'Athènes, proposant une technique nouvelle pour mettre en évidence la déviation du complément.

Monsieur LASAUSSE nous réservait ainsi cette étude pour une thèse de Pharmacie que nous présentons aujourd'hui.

Nous rappellerons tout d'abord les termes de la communication de Messieurs Ed. LASAUSSE et L. FROCRAIN :

« Mise en évidence de la déviation du complément par mesure de la vitesse d'hémolyse.

» Application à la réaction de Bordet-Wassermann.

» Il est commode de mettre en évidence la déviation du complément dans la réaction de Wassermann, en déterminant les vitesses d'hémolyse.

» L'expérience typique suivante rendra compte de cette possibilité ; dans deux tubes 1 et 2, on introduit dans l'ordre indiqué.

	1	2
Eau physiologique (à 9/1.000)	1 cc 20	1 cc 80
Antigène de Bordet Ruelens au 1/10..	0 cc 90	0 cc 90
Sérum de malade inactivé	0 cc 60	0 cc 00
Alexine 1/5	1 cc 05	1 cc 05
Sérum hémolytique 1/20 (1)	2 cc 25	2 cc 25
Purée globulaire lavée et non diluée (mouton)	3 cc 00	3 cc 00

Tous ces réactifs préalablement portés à + 15°C. Le mélange est rendu homogène et maintenu à + 15° C. pendant un temps variable.

La quantité de complément introduite se partage naturellement entre les deux systèmes capables de la dévier : système antigène-anticorps et système globules-sérum hémolytique, de sorte que plus le sérum à examiner renferme d'anticorps syphilitiques, plus le complément est dévié et par conséquent moins l'hémolyse est énergique. Les deux mélanges ayant une composition identique, (aux anticorps syphilitiques près), ce sont ces anticorps seulement qui pourront ralentir l'hémolyse dans le tube n° 1 par rapport au n° 2.

Ce retard sera très facilement mis en évidence par comparaison colorimétrique, après centrifugation d'une prise d'essai effectuée dans chacun des deux tubes. Le volume total du contenu de chaque tube étant de 9 cc, on pourra faire six prises d'essai de 1 cc 5. Une centrifugation de 2 minutes fournira le liquide clair à introduire dans une cellule de 1 cc 0 et on déterminera la densité optique à l'aide du colorimètre à cellule photoélectrique. Les déterminations faites à des intervalles d'une demi-heure permettront de tracer les deux courbes représentant les variations dans le temps de ces densités. Les résultats numériques seront multipliés par 100 conformément aux indications fournies par Vernes pour l'utilisation de son photomètre syphilimétrique.

(1) Le sérum hémolytique anti-mouton que nous avons utilisé pour cet essai, est un sérum qui, employé à la dose de 0 cc 1 d'une dilution au 1/200, en présence de 0 cc 4 d'alexine au 1/10, hémolyse complètement 1 cc d'une suspension au 1/20 de globules de mouton à 37° au bout de 30 minutes.

Pour tracer les deux courbes, les temps seront portés en abscisses et les variations de la densité optique en ordonnées.

Voici les résultats numériques observés dans une expérience :

	100 D		X		$X^2 - X^1$
	N° 1	N° 2	N° 1	N° 2	
Temps 0	332	334	»	»	»
30 minutes	331	280	1	54	53
60 »	325	201	7	133	126
90 »	322	185	10	149	139
120 »	317	177	15	157	142
180 »	313	174	19	160	141
240 »	311	170	21	164	143

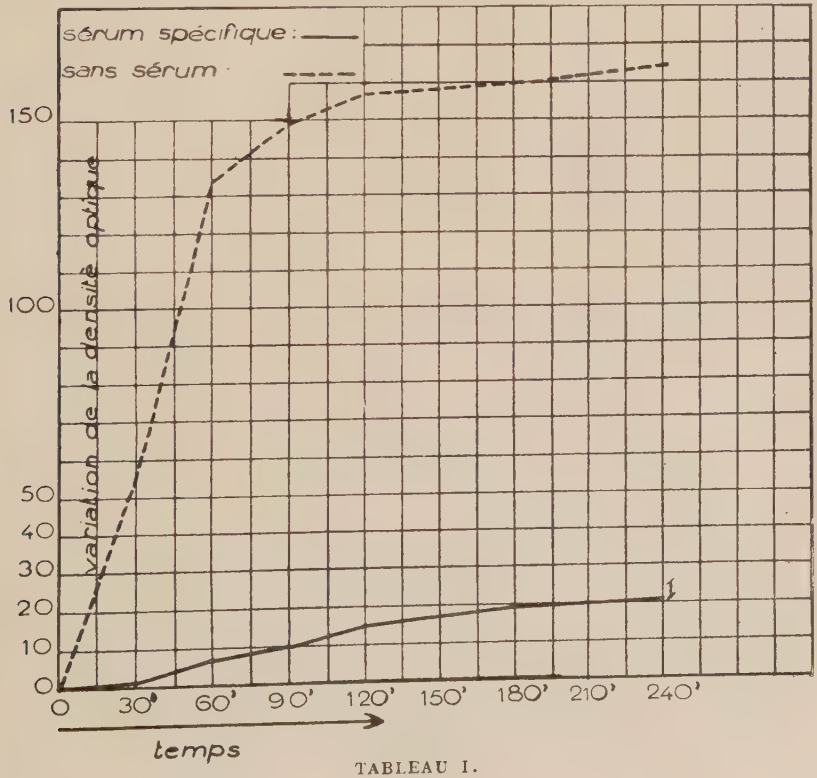


TABLEAU I.

Si on traduit en courbe le tableau ci-dessus (Tableau I) on voit que la quantité X qui représente l'augmentation de la densité optique multipliée par 100 depuis l'instant initial, croît beaucoup moins rapidement dans le mélange contenant le sérum syphilitique que dans le témoin, ce qui est conforme aux prévisions.

Les deux courbes s'écartent régulièrement pendant les 60 premières minutes, puis, pendant les 60 minutes suivantes l'écart augmente encore mais moins rapidement, enfin à partir de la deuxième heure, les courbes tendent à rester parallèles pendant les quatre heures que dure l'expérience (dans d'autres essais le parallélisme a duré 24 heures).

Au bout de 1 heure par exemple, la quantité X qui est égale à 7 pour le tube N° 1 (avec sérum syphilitique) est égale à 133 pour le témoin. On voit l'importance de l'écart final dû à la présence des anticorps syphilitiques.

On peut, au lieu de sérum artificiel, employer si l'on veut dans les tubes témoins n° 2 un sérum humain non syphilitique, l'écart (X^2 — X^1) entre le sérum sain et le sérum syphilitique reste néanmoins du même ordre de grandeur (Tableau II).

Dans divers essais tantôt la courbe du sérum sain est située au-dessus de celle fournie par le sérum artificiel, tantôt elle est située légèrement au-dessous sans que nous puissions indiquer la cause de cette modification.

Dans l'essai représenté par la *courbe I* (Tableau I), nous avions à faire à un sérum sûrement syphilitique, fourni par un malade en pleine période secondaire en évolution, et donnant du reste des résultats positifs très nets aux réactions Calmette-Massol, Hecht-Rubinstein et Kahn.

Sur ce sérum, nous avons cherché les modifications entraînées par la variation des conditions d'expérience. Nous avons fait varier les différents facteurs : charge en globules, concentration en hémolysine, concentration en alexine, suivant toutes les combinaisons possibles, et aussi, le facteur température dont l'influence est considérable.

En effet, à mesure que la température baisse, l'activité de l'hémolysine diminue beaucoup plus vite que la déviation complémentaire par l'antigène. Les conditions opératoires que nous avons données plus haut sont celles qui nous ont fourni les résultats les plus expressifs et nous avons vu qu'elles sont caractérisées par des concentrations assez fortes en hémolysine, en complément et en globules.

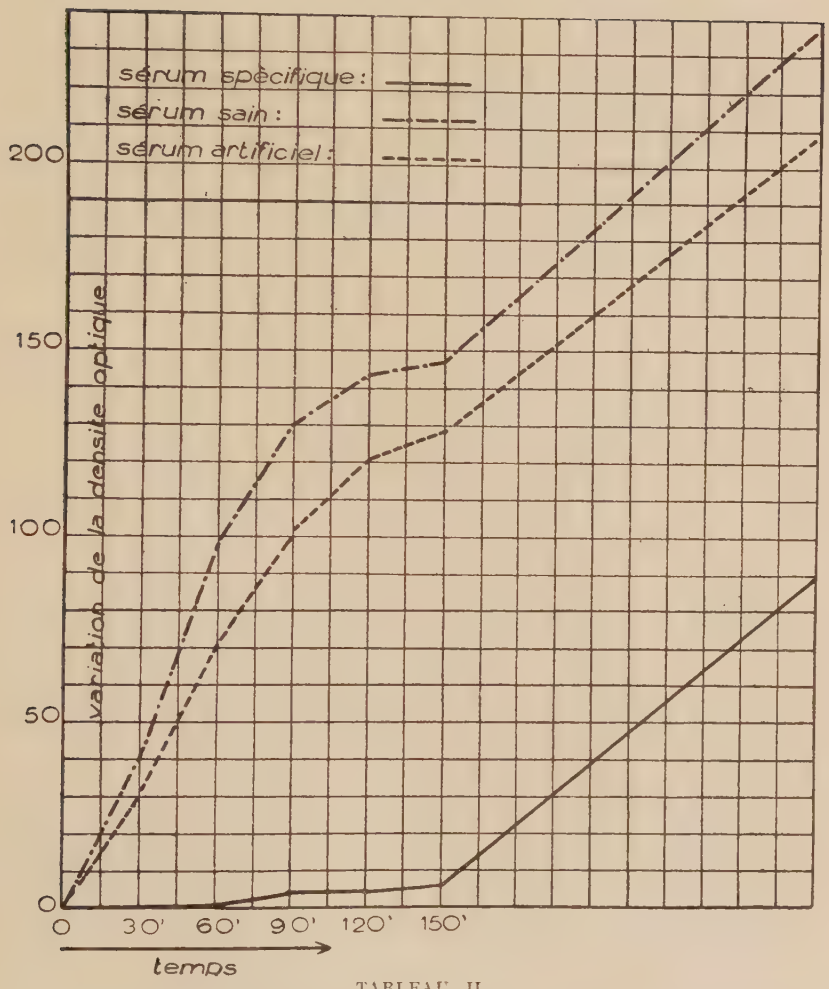


TABLEAU II.

Pendant l'évolution du phénomène d'hémolyse, on peut constater que l'écart ($X^2 - X^1$) reste sensiblement égal au 9/10 de la valeur de X^2 de sorte que le rapport $\frac{X^2 - X^1}{X^2}$ est égal approximativement à 0,9 (X^2 étant rapporté au témoin fourni par le sérum artificiel).

Ce même rapport nous l'avons trouvé dans tous les essais que nous avons entrepris sur le même sérum, dans ces conditions il s'est montré :

a) indépendant des températures employées (10° et 15° C) ;

b) indépendant aussi de l'activité du système hémolytique (concentration en complément et concentration en hémolysine).

On conçoit l'intérêt pratique de cette constatation qui rend les résultats de l'essai beaucoup plus faciles à acquérir puisqu'on est moins soumis à la nécessité d'un contrôle serré des réactifs tel qu'il est exigé pour une réaction de Wassermann correctement conduite, selon la technique, par exemple, de Calmette Massol ou de Meersemann.

On peut se donner comme règle, d'employer toujours 1 cc 05 d'un complément moyen et d'opérer à la température de + 15° C qui est d'un emploi très commode au laboratoire et qui nous a donné le maximum d'écart (X^2—X^1). Quant au sérum hémolytique, on le titre une seule fois dans les conditions indiquées et on l'amène à une dilution telle qu'il donne en deux heures une valeur X^2 de l'ordre de 150.

Nous nous bornons pour le moment à la description de cette expérience type, en nous réservant de revenir plus tard sur les essais fournis par des sérums syphilitiques d'une activité variable. Nous rechercherons aussi les simplifications de la méthode qui pourraient résulter de l'emploi de sérum hémolytique anti-humain conjointement avec les globules du sérum à essayer.

Nous indiquerons seulement, qu'en substituant des sérums à Wassermann faiblement positifs au sérum précédent fortement positif, on constate une diminution de l'écart (X^2 — X^1), de sorte qu'il nous paraît déjà probable, que cet écart peut comme cela se passe dans la technique de Vernes, servir à repérer la richesse d'un sérum en anticorps syphilitiques.

On sait que dans certains cas les sérums peuvent renfermer de fortes quantités de substances empêchant l'hémolyse. Le fait est signalé dans la réaction de Wassermann, par les tubes témoins restés incolores, et cette réaction ne peut être interprétée.

La technique qui vient d'être décrite doit à cet égard être complétée par un mélange témoin contenant toujours le sérum à essayer, mais ne contenant pas d'antigène. L'hémolyse doit y suivre la même marche que dans le mélange où le sérum à essayer est absent.

Nous devons dire que nos essais de la méthode ne nous ont pas présenté un tel cas.

Bien entendu, si l'on veut économiser le sérum à essayer, on peut, au lieu de tracer les trois courbes, se contenter de déterminer un point de chacune d'elles, au bout de 120 minutes d'hémolyse, par exemple ; quatre lectures sont alors suffisantes ».

II. — DESCRIPTION DE L'APPAREIL EMPLOYÉ PAR NOUS POUR LA MESURE DES VARIATIONS DE DENSITÉ OPTIQUE

Cet appareil : le néphélo-colorimètre à cellule photoélectrique — montage de Marc Bassière (du laboratoire de Chimie minérale de la Sorbonne) — comprend de gauche à droite (cf. schéma) : une lampe L, un condensateur c, un filtre f, un cuve à faces parallèles d, une cellule photoélectrique p, en avant, un tableau de contrôle.

Il nécessite une batterie de 10 à 12 volts et un galvanomètre g:

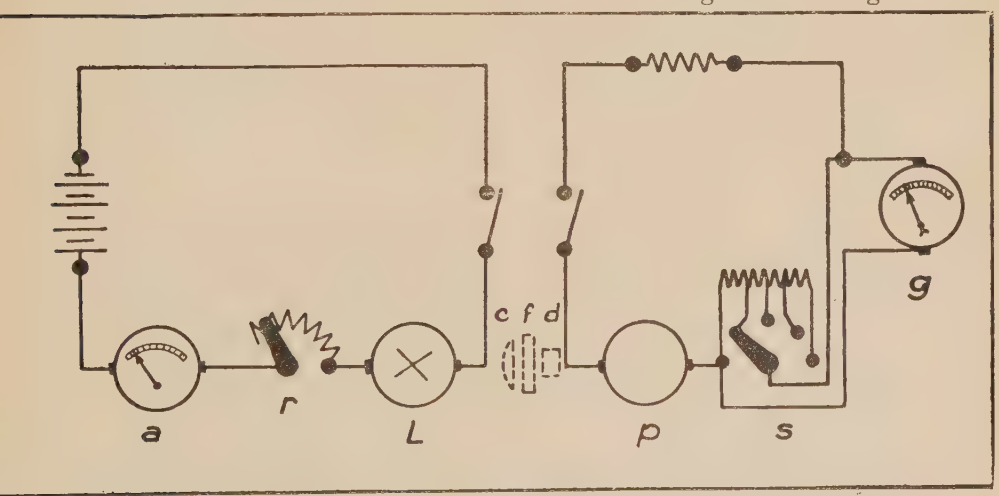


Schéma du néphélo-colorimètre à cellule photoélectrique employé.

La lampe L :

est une lampe ponctuelle Philips pour micro projection, 8 V - 6 A, — elle est montée sur un support permettant de la déplacer en largeur et en hauteur ; — un tube vissé sur ce support masque la lampe aux regards.

Le condensateur c :

est monté sur un support mobile longitudinalement.

Le filtre f :

Nous employons pour les mesures des vitesses d'hémolyse un filtre bleu.

Il évite l'échauffement du liquide en expérience. Il est d'une couleur complémentaire de la variation de couleur observée.

La cuve d :

cuve à faces parallèles en verre, est entièrement démontable, ce qui permet un nettoyage facile. Elle est constituée par deux glaces serrées par un intermédiaire qui définit l'épaisseur de liquide utilisée.

Le système de serrage, en métal chromé, maintient les trois pièces, une feuille de caoutchouc répartissant les pressions. Quatre boutons moletés en permettent le démontage rapide.

Nous employerons, dans nos mesures, une épaisseur de liquide de 10 millimètres (le volume de la cuve est alors d'environ 1 cc) ou de 5 millimètres (volume de la cuve environ 0,50 cc).

La cellule photoélectrique p :

est une cellule à oxyde de cuivre, type 3.001 A du " Matériel téléphonique ". Elle est montée derrière un tube évitant que la lumière diffuse ne vienne l'impressionner, et contre lequel elle vient s'appliquer.

Le tableau de controle comporte :

A gauche : le circuit de lampe, comprenant deux bornes qui doivent être reliées aux accumulateurs, un interrupteur, un rhéostat (r) qui permet de régler l'intensité du courant à 6 ampères, ce que l'ampèremètre (a) permet de contrôler.

A droite : le circuit de cellule, comprenant un contacteur de shunts (s) et un interrupteur, 2 bornes auxquelles on relie le galvanomètre g.

Galvanomètre g :

On ne doit évidemment employer, avec le néphélocolorimètre, que celui avec lequel il a été étalonné.

Manipulation de l'appareil :

A chaque série de mesures, nous recommandons de vérifier que l'appareil est en ordre de marche en s'assurant que :

la lampe est centrée.

le condensateur réglé.

le filtre placé.
le courant de la lampe réglé à 6 A.
le galvanomètre réglé au zéro.

La cuve, remplie du liquide à examiner, étant placée sur son support, allumer la lampe, fermer le circuit du galvanomètre, et chercher un plot du contacteur qui amène le spot du galvanomètre entre les divisions 20 et 100, en commençant toujours par le plot 500. Ceci afin de ne pas risquer d'envoyer dans le galvanomètre un courant trop intense.

On note alors le plot sur lequel se trouve le contacteur et la division à laquelle se fixe le galvanomètre.

EXPRESSION DES RÉSULTATS :

On chiffre les résultats en accroissement de "densité optique" (logarithme décimal du rapport $\frac{I^o}{I}$) résultant de la coloration. (I^o étant l'intensité observée au sortir de la cuve avant coloration - I l'intensité observée sur la solution colorée.) * On obtient ce nombre en prenant sur le graphique fourni avec l'appareil la différence des ordonnées correspondant aux plots et déviations trouvés avant et après la réaction colorée.

Ces courbes ont été établies par des mesures sur des liquides de densités optiques connues.

EXEMPLE DE MESURE :

Avant la réaction colorée :

Plot 20 — Déviation D 75 ——> ordonnée 268 : (densité optique d en 1/100 de densité).

Après la réaction colorée :

---

* *Densité optique :* logarithme décimal du rapport $\frac{I_o}{I}$

Exemple : si on pose égale à 100 l'intensité du courant obtenu quand la cuve ne contient que le solvant pur (I_o), et, si après coloration cette intensité (I) n'atteint que 50, le rapport : $\frac{I^o}{I} = \frac{100}{50} = 2$ dont le logarithme décimal est 0,30103 et la densité optique en valeur absolue de la solution colorée examinée est égale à ce dernier chiffre.

Accroissement de densité optique : Il représente la variation du logarithme du rapport $\frac{I_o}{I}$ résultant de la variation de l'absorption de la lumière à l'intérieur de la cuve lorsque les colorations varient.

Plot 5 — Déviation D 50 ——> ordonnée 190 : (d en 1/100 de densité).

La variation de densité optique est : 268 — 190 = 78.

Elle est exprimée en 1/100 de densité, qui est l'unité employée dans les appareils Vernes.

Controle de l'appareil :

Ce type d'appareil est réputé donner une erreur qui n'est pas supérieure à 1 % ; il doit être entretenu avec soin : il faut veiller à ce qu'il ne soit pas laissé dans une atmosphère humide ou au contact de vapeurs corrosives.

Une bonne précaution sera de tracer la courbe d'étalonnage de l'appareil donnant $d = 100 \log. \frac{I^o}{I}$ en fonction de l'intensité observée au galvanomètre par le courant produit par la cellule.

On tracera cette courbe à partir de solutions ayant des caractères colorés définis (par exemple la solution cuivrique d'un Réactif de Fehling ou une solution de bichromate de K.)

On sait que les intensités observées au galvanomètre sont fonction de la déviation du galvanomètre et de la valeur du shunt utilisé (N° du plot) qui intervient comme paramètre dans les courbes tracées. Les valeurs absolues de ces intensités n'ont pas besoin d'être connues, mais leurs valeurs relatives seulement, puisque seul le rapport $\frac{I^o}{I}$ intervient.

De temps en temps il sera bon de vérifier la stabilité des graduations, les courbes de densités optiques obtenues avec les différentes résistances pour les solutions colorées déterminées doivent en effet se raccorder. Si par accident les courbes ne se raccordaient pas, partant de la courbe d'étalonnage dont nous avons parlé plus haut, et à partir des mêmes solutions colorées, on pourra établir les corrections nécessaires.

III. — RAPPEL DE CONCEPTIONS THÉORIQUES RELATIVES A L'ÉPREUVE DE B. W.

Cette épreuve consiste essentiellement à constater la disparition (déviation) d'un facteur thermolabile (le complément) sous l'influence d'un complexe (antigène - sensibilisatrice). Cette constatation se fait par l'introduction d'un deuxième complexe (hémolysine - globules) lequel, en présence de complément, libère le pigment coloré des globules rouges mis en œuvre (hémolyse).

Donc, cinq facteurs au moins interviennent dans les deux phases de la réaction totale.

***

La nature intime des transformations qui interviennent est aussi mal connue que l'identité chimique des facteurs précédents.

L'antigène de B. W. est-il un véritable antigène ? c'est-à-dire détermine-t-il dans l'organisme auquel on l'injecte, l'apparition d'anticorps, précipitables in vitro sous son influence ?

Etant donné sa nature lipoïdique, le fait peut être mis en doute ; néanmoins il floculerait le sérum des syphilitiques, de plus il est capable d'agir à doses infinitésimales, de sorte qu'il fonctionne peut-être comme un catalyseur dans la fixation du complément sur la sensibilisatrice, d'autant que, dans cette fixation, il ne paraît pas y avoir de relations pondérales entre l'antigène et le complément *(41)*.

Les autres facteurs intervenant dans le B. W., quoique mal connus chimiquement, interviennent d'une façon quantitative comme le montre la nécessité des étalonnages du système hémolytique — c'est-à-dire l'établissement des correspondances entre — [globules] [complément] constantes à [Hémolysine] variable et [globules] [Hémolysine] constantes à [complément] variable intervenant dans les réactions classiques.

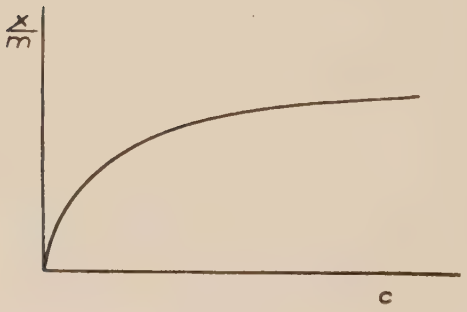
Cependant l'antigène est aussi titré vis-à-vis des [complément] [globules] [Hémolysine] constantes pour fixer les temps convenables d'hémolyse.

*
**

En ce qui concerne la nature même des transformations qui s'effectuent dans ces essais, il y a de bonnes raisons de croire que les phénomènes d'adsorption colloïdale y jouent un rôle important auprès de véritables transformations chimiques.

Il faut à ce sujet relire le Précis de Chimie Physique de Fred Vles *(91)* qui a dégagé d'une lumineuse façon les faits acquis jusqu'en ces dernières années.

Nous rappellerons seulement les caractères des phénomènes d'adsorption en solution, phénomènes limités, théoriquement réversibles, dans lesquels le rapport x/M de la masse adsorbée à la masse adsorbante n'est pas proportionnel à la concentration C du corps adsorbé dans le milieu extérieur au moment où l'équilibre est atteint, mais obéit à la loi $x/M = \alpha C^n$ (à température constante) : Loi de Freundlich - tout au moins pendant une partie de la courbe car pour des concentrations assez élevées de C, la courbe représentative prend l'allure d'une courbe de saturation.



Enfin un corps adsorbé peut être déplacé de son support par un autre qui prend sa place. La vitesse du phénomène est dans certains cas observable.

S'il s'agissait d'une véritable combinaison chimique :

$x/M = \alpha$ (Lois de Proust et Dalton).

D'après les observations faites par Lasseur et Spillmann *(47)* les relations entre le complément et la sensibilisatrice dans l'hémolyse, la quantité de globules rouges restant constante, satisfont à :

Premier type :

$C^1 (C^2 - a) = K$

C^1 = concentration en sensibilisatrice

C^2 = concentration en complément
K et a, facteurs constants.

DEUXIÈME TYPE :

$(C^1 - a)(C^2 - b) = K$.

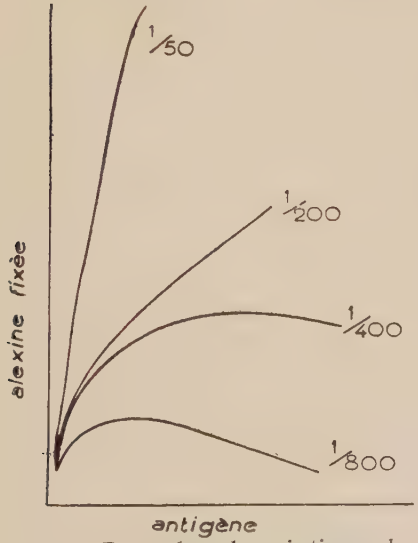
Une concentration minima de complément ou de sensibilisatrice est nécessaire pour permettre l'hémolyse.

La température peut jouer un rôle important sur la fixation du complément dont elle modifie la vitesse et l'équilibre.

La fixation du complément se présente comme une transformation limitée et le complément fixé est difficile à éliminer par l'eau physiologique.

*
**

Lasseur et Spillmann ont étudié aussi les courbes de fixation du complément en présence d'un *antigène véritable ;* ces courbes sont très régulières. Chacune d'elles a été obtenue avec une concentration fixe en sensibilisatrice.



La quantité de complément fixée croît avec la quantité d'antigène utilisée (portée en abscisse) et avec la quantité de sensibilisatrice, mais pour de faibles concentrations en sensibilisatrices : (1/800) la courbe passe par un maximum.

L'allure générale rappelle celle des courbes d'adsorption pour des concentrations suffisantes en hémolysine.

Il reste toujours du complément libre dans le milieu.

*
**

Dans les descriptions données pour les différents types de R. de B. W., on parle parfois de substances anticomplémentaires, ou de substances antihémolytiques existant dans les sérums, et l'on peut se demander si ces substances ont une existence réelle — si elles modifient les équilibres ou seulement les vitesses avec lesquelles ceux-ci sont atteints.

On emploie ces expressions quand l'addition d'un sérum x à un système hémolytique bien équilibré suffit à déplacer l'équilibre et à gêner l'hémolyse en l'absence d'antigène.

Si l'équilibre se rétablit par addition de complément, on dit que le sérum x contenait une substance anticomplémentaire ; si l'équilibre se rétablit par addition d'hémolysine : que le sérum x contenait une antihémolysine.

Nous savons déjà que complément et hémolysine se compensent vis-à-vis de leur action sur le globule, autrement dit que l'on peut pallier à une insuffisance de concentration de l'un par une augmentation de concentration de l'autre, du moins entre certaines limites. On peut donc se demander si pouvoir anticomplémentaire et pouvoir antihémolytique ne sont pas attribuables à un unique phénomène.

*
**

Nous sommes alors amené à parler des travaux de Maurice Renaud *(75)* et des conceptions si intéressantes auxquelles ses travaux donnent un point d'appui.

M. Renaud fait un rapprochement entre :

l'inactivation d'un sérum à 56° ;

la déviation du complément sous l'influence de l'antigène en présence d'un anticorps ;

la déviation spontanée du complément présentée par un sérum (en l'absence d'antigène).

Dans les trois cas les propriétés qui caractérisent la présence de complément ont disparues, ou se sont atténuées. Il y a destruction du complément, et M. Renaud considère qu'il y a là seulement trois aspects différents d'un même phénomène, qui résulterait simplement de variations dans la vitesse de disparition du complément.

L'antigène lipoïdique du B. W. deviendrait ainsi une sorte de couple catalytique positif de cette transformation—l'accélérant davantage dans les sérums de syphilitiques que dans les sérums normaux, par suite de la présence, dans les premiers, des anticorps spécifiques entraînant une modification profonde de l'équilibre colloïdal.

Sérologiquement il est impossible de faire un départ net entre les uns et les autres, et l'on trouve entre eux toutes les transitions.

La déviation spontanée (en l'absence d'antigène) ou " pouvoir anticomplémentaire " n'est précisément, pour M. RENAUD, qu'une perturbation dans l'équilibre colloïdal des sérums qui la présentent.

Le sérum normal d'un sujet jeune, bien portant, ne présente, à moins d'exception, qu'une déviation spontanée très faible, et l'addition d'antigène P. n'augmente pas sensiblement cette déviation.

De même quand l'équilibre est normal, la teneur en complément n'est pas éloignée d'une certaine moyenne.

Si un antigène P. accentue cette déviation du complément, alors, pour un écart suffisant, on peut conclure à une haute perturbation de l'équilibre colloïdal, ce qui fournira un signe important au clinicien pour établir la probabilité de l'infection syphilitique.

IV. — ESSAIS PRÉLIMINAIRES

Dans ce chapitre nous reprendrons les essais, qui, avec Messieurs LASAUSSE et FROCRAIN, nous amenèrent à la mesure de la déviation du complément dans le séro-diagnostic de la syphilis par les réactions d'hémolyse, en appréciant les vitesses d'hémolyse à la cellule photoélectrique.

*
**

L'idée de départ de ce travail fut de chercher un moyen de simplifier et aussi de standardiser la Réaction de Wassermann. — Ravaut a pu dire du B. W. : « Tant vaut le sérologiste, tant vaut la réaction ».

Léger et Martin constatent, peut-être avec une certaine exagération que : « la réaction de B. W. avec certains sérums, est sujette à des différences telles, d'un laboratoire à l'autre, et parfois aussi pour le même laboratoire d'un jour à l'autre, qu'il est impossible de s'appuyer sur elle en toute confiance » *(49)*.

L'infidélité de l'épreuve tient non seulement à l'inconstance des réactifs, à laquelle on peut parer en prenant l'ensemble des précautions classiques, mais surtout à la sensibilité que l'on demande à la réaction. Avec une sensibilité exagérée on trouvera une plus grande proportion de sérums à équilibre colloïdal perturbé et par conséquent une plus grande quantité des sérums seront déclarés positifs... avec une sensibilité diminuée ce sera la contraire... c'est pourquoi nous nous sommes attaché à approfondir l'étude d'une méthode qui nous donnait l'espoir de pouvoir travailler à " sensibilité constante ".

Dès lors nous avons cherché d'une part, à fixer le plus possible les diverses variables sous la dépendance desquelles se trouve la R. de W. du fait des nombreux constituants biologiques du système : sérum de cobaye, hémolytique, humain, antigène, hématies... d'autre part et surtout, à faire, avec le maximum

d'exactitude et d'objectivité la lecture de la réaction, appréciation qui varie tellement avec le sérologiste que G. Belgodère, médecin du Dispensaire de Saint-Lazare à Paris va jusqu'à dire qu' « il lui semble important que le sérologiste soit toujours le même, car le tour de main de l'opérateur entre pour une certaine part dans le résultat obtenu, de sorte que les diverses réactions effectuées à des époques différentes ne lui paraissent comparables qu'à cette condition » *(3)*.

Notre désir était aussi d'arriver, pour la méthode hémolytique, à obtenir des résultats chiffrés, constituant un repérage de l'intensité du trouble humoral et permettant d'en tracer la courbe dans le temps. Certes, l'intensité du trouble humoral ne doit pas servir de base d'appréciation au clinicien pour juger de la gravité d'un état pathologique, ou pour établir une thérapeutique, mais nous pensions, et le docteur Vernes l'a bien montré, que la vitesse d'atténuation du déséquilibre, sous l'influence d'une thérapeutique, n'est pas une donnée négligeable.

Sur ces points nous avions comme exemple à suivre le magnifique travail du docteur A. Vernes pour les méthodes de floculation.

Nous avons cherché à donner aux réactions d'hémolyse toute la sécurité et la précision d'une mesure électrique qui ne laisse aucune part aux sens de l'opérateur... en remplaçant les qualités visuelles du sérologiste — non sa science — par la lecture du chiffre de la cellule photoélectrique qui « constitue un véritable œil électrique, mais un œil beaucoup plus sensible que l'œil humain » *(51)* plus perfectionné aussi.

*
**

La réaction de B. W., technique Calmette-Massol (l'une des meilleures) compte deux phases :

La première qui se passe à 37° C où l'antigène P, le sérum x et le complément étant mis en contact forment un bloc antigène-anticorps-complément lorsqu'il y a des anticorps syphilitiques dans le sérum en expérience, bloc qui emprisonne le complément préalablement titré afin d'être entièrement incorporé dans le cas d'un sérum fortement positif.

La deuxième, à 37° C aussi, qui détecte la présence ou la disparition du complément introduit dans la première phase, à l'aide de globules rouges de mouton et d'un sérum antiglobules de mouton.

Ce sérum hémolytique amène, lorsqu'il reste du complément libre, c'est-à-dire lorsqu'il n'y a pas d'anticorps syphilitiques dans le sérum du malade, une hémolyse par dissolution des globules de mouton ; dans le cas contraire il n'y a aucune hémolyse des globules.

On sait d'autre part que la fixation du complément par le mélange antigène-anticorps se fait aussi bien à des températures basses qu'à 37° C et se fait vite, alors que l'hémolyse par action de la sensibilisatrice sur les globules de mouton est lente, et semble d'autant plus lente que la température est plus basse.

Partant de ces données, nous avons cherché, les constituants des deux phases étant mis directement en contact, et le complément se partageant entre les deux systèmes réunis, c'est-à-dire les quatre réactions suivantes se partageant les constituants du mélange :

Anticorps A + Antigène A' ——> AA'
AA' + complément C ——> AA'C
Hémolysine H + Globules G ——> HG
HG + C ——> HGC : hémolyse.

des conditions telles que la vitesse d'hémolyse soit complètement nulle en présence d'une grande quantité d'anticorps syphilitiques, et d'autant plus retardée que le sérum contient plus de ces anticorps.

Nous nous proposions, quand ce but serait atteint, d'arrêter brusquement la réaction d'hémolyse et de mesurer la vitesse d'hémolyse, fonction inverse de la richesse en anticorps du sérum, en appréciant la différence de densité optique avant et après réaction.

Pour cette mesure nous nous proposions d'employer le néphélocolorimètre décrit p. 27 dont la cellule photoélectrique, éclairée par une luminosité variant proportionnellement à la vitesse d'hémolyse du liquide en réaction, donne un courant électrique fonction de la quantité de lumière reçue et lisible sur un galvanomètre.

Les divers sérums en réaction seraient chiffrés par rapport à la vitesse d'hémolyse dans les mêmes conditions d'un complexe où le sérum de malade serait remplacé par du sérum physiologique.

Bernard et Joltrain *(5)* avaient montré dès 1910, que dans une R. de W. employant le sérum humain frais et un système

antihumain, « on peut mettre les hématies en même temps que les autres éléments de la réaction »... mais l'action réciproque de tous ces constituants les uns sur les autres, les quantités optima des divers réactifs à employer, les conditions de mesures des variations de densité optique : tout était à étudier.

Des essais complexes et longs, qui ont conduit à la méthode que nous décrirons plus loin, nous ne donnerons que les principales manipulations et conclusions.

De quelques définitions :

On appelle *Alexine* (Bordet-Buchner) — Complément (Ehrlich) — Cytase (Metchnikoff) une substance existant normalement dans le sérum de tous les animaux *(22)* où elle préexiste à toute immunisation, et qui est nécessaire pour donner en présence d'un anticorps une fixation d'un antigène. Elle est thermolabile (nous entendons par là qu'elle est détruite par un chauffage à 56°).

Sous le nom générique d'*antigène* on désigne toute substance de nature protidique et différente des protides tissulaires qui, injectée à un animal, détermine dans le plasma de ce dernier, l'apparition d'une substance appelée " anticorps " capable de se combiner spécifiquement avec l'antigène injecté.

Nous avons conservé le terme d' " antigène " pour désigner les extraits employés dans le B.W. ; toutefois, afin de bien montrer que nous ne voulons pas préjuger de leur mode d'action et pour les bien distinguer des vrais antigènes, nous appellerons antigène P (du qualificatif " précipitogène " qu'a proposé Demanche) tout extrait servant aux réactions de floculation ou de déviation du complément dans le séro-diagnostic de la syphilis. En effet, la réaction de B. W. « initialement admise comme une application directe de la R. de Bordet-Gengou s'avèrant aujourd'hui une réaction de fixation de l'alexine par des complexes floculants » *(91)* il est évident que l'extrait employé n'a pas la spécificité incluse dans le terme " antigène ".

L'*Anticorps* — sensibilisatrice (Bordet) — ambocepteur (Ehrlich) — philocytase (Metchnikoff) est un produit d'immunisation strictement spécifique *(22)* (c'est-à-dire n'agissant que sur l'antigène qui lui a donné naissance) — il est thermostabile (c'est-à-dire résiste au chauffage à 56°).

Nous avons conservé le terme d'anticorps pour désigner la cause de la transformation révélée dans un sérum de syphilitique par le B. W. ; mais nous ferons toujours suivre ce terme du qualificatif : syphilitique, et nous employerons souvent le terme moins spécifique de " réagine ", pour bien montrer que nous ne voulons pas non plus préjuger de la spécificité de ce produit.

Nous appellerons : *sérum x* tout sérum suspect à analyser.

Sous le nom de *sérum* Σ nous entendrons des sérums présentant un trouble de l'équilibre colloïdal décelable par l'épreuve de B. W. (ces sérums sont fréquents dans la syphilis en évolution, d'où le terme employé.

Sous le nom de *sérums syphilitiques* nous désignerons les sérums de malades présentant les signes cliniques d'une syphilis en évolution.

On appelle *Hémolysine A -anti-globules X,* l'anticorps hémolytique spécifique intervenant dans l'hémolyse des globules X (antigène) par le sérum A inactivé.
L'hémolysine hémolytique anti-mouton employée par nous a été définie dans la note qui sert d'introduction à ce travail (p. 20) ; nous en donnerons plus loin (p. 131) une définition, basée sur la mesure à la cellule, de l'hémolyse produite par son action sur un excès de globules en présence d'une dose fixe de Cpl, dans les conditions qui seront établies plus loin, de température, de volume et de temps.

Comme Ronchèse *(76),* nous adopterons les termes de " sensibilisatrice " hémolytique et de " complément " ; nous donnerons le nom de " complexe hémolytique " au complexe : sensibilisatrice hémolytique + Cpl., et celui de " système hémolytique " au mélange : sensibilisatrice hémolytique + globules + Cpl.

Nous ne définirons pas d'unité de Cpl. ; mais nous désignerons dans nos essais sous le nom de Cpl. : le mélange des sérums d'au moins 3 cobayes adultes mâles à jeun non ponctionnés depuis au moins 1 mois, sérums centrifugés aussitôt défibrination ou coagulation, conservés à la glacière à + 2°C de 12 à 24 heures, et dilués à l'E.P. au moment de l'emploi.

I. — Influence de la Température et du Système Hémolytique sur la Vitesse d'Hémolyse :

1°) *De la température et du complexe hémolytique (concentration en sensibilisatrice et en Cpl.)*

Ayant établi une série de mélanges, afin de déterminer quelques concentrations minima en complément et sensibilisatrice, capables de donner en 30 minutes à + 37°C en présence d'une quantité constante de globules une hémolyse totale, nous avons vérifié qu'à + 3°C ces mêmes complexes et d'autres plus forts ne donnent aucune hémolyse, même après plusieurs heures, et que, portés à 37°C ces mélanges donnent après 10 minutes une hémolyse importante.

Ainsi, partant du mélange I :

E. P.	3 cc. 75
Cpl. au 1/10e.	0,45
S. H. au 1/200e.	2 cc. 5
Suspension globulaire à 1/20e.	3,30

Nous voyons qu'à 37°C il est hémolysé complètement en environ 60 minutes ; si nous doublons les doses de Cpl. et de S. H. (mélange II) l'hémolyse est totale après moins de 30 minutes ; si nous la quadruplons (mélange III) l'hémolyse est complète après 10 minutes.

Opérant à + 10°C avec ces 3 mélanges, nous remarquons qu'après 10 minutes : l'hémolyse nulle en I et II, apparaît en III.

Après 30 minutes : toujours nulle en I et II, elle s'accentue en III.

Après 1 heure : nulle en I, très légère en II, elle est totale en III.

Après 3 heures : l'hémolyse très légère en I, s'est fortement accentuée en II.

2°) *De la température et du système hémolytique :*

Les essais ont été menés à des températures variables dans des temps variables avec les 3 complexes hémolytiques suivants :

	I	II		III
S. H. à 1/200e. . . .	2 cc. 5	5 cc.	S. H. à 1/10	: 0 cc. 5
Cpl. au 1/5e.	0 cc. 45	0 cc. 90		1 cc. 8

formant un grand nombre de systèmes hémolytiques par addition

de quantités de globules de mouton (au 1/20e - au 1/10e - purs) croissantes. Ces mélanges étaient portés par l'eau physiologique à un même volume de 10 cc.

Ces essais nous ont amené à conclure que :

1°) pour un même système hémolytique la vitesse d'hémolyse augmente avec la température ; l'hémolyse étant arrêtée à environ + 3°C.

2°) pour une température donnée la vitesse d'hémolyse est d'autant plus grande que le complexe hémolytique est plus fort.

3°) à une température donnée et pour un complexe hémolytique fixe, la limite du pouvoir hémolytique de ce complexe semblant atteinte, la vitesse d'hémolyse n'augmente guère avec un excès de globules.

II. — Influence du Système Antigène P. — Anticorps sur la Vitesse d'Hémolyse.

Nous nous sommes servi, pour cette étude, de sérums humains inactivés, les uns provenant de sujets n'ayant, au point de vue clinique et sérologique, aucun signe de syphilis, les autres de syphilitiques en période secondaire accusant des réactions très positives aux : R — M.T.R. — K — C.M. — J.

Le mélange de base de notre étude était :

E.P. à 9 °/oo	2,2
Antigène Bordet-Ruelens au 1/10e	2 cc.
Sérum humain inactivé	1,2
Cpl. au 1/10e	4 cc.
S.H. au 1/20e	1 cc.
Suspension globulaire au 1/20e	10

Soit I le mélange avec le sérum syphilitique ; II le mélange avec le sérum sain.

Au bout de 5 heures de réaction à + 10°C l'hémolyse en II n'est encore que très légère ; elle devient rapide en portant le mélange à 20°. L'hémolyse est nulle ou presque nulle en I. Il apparaît donc que la différence de vitesse d'hémolyse entre le mélange contenant le sérum syphilitique et celui contenant le sérum négatif, mélanges dans lesquels seule varie la charge anticorps syphilitique, est régie par la température et la force du système hémolytique (concentration en hémolysine, globules, Cpl.) dont les lois d'action ont été établies par Lasseur et Spillmann *(47)*.

Nous avons choisi, pour notre mélange de base, une quantité d'antigène qui, proportionnellement au volume de sérum humain et au volume total en réaction, est sensiblement égale à celle que nous employons dans le C.M.

Nous avons résolu, empiriquement — nous réservant de le contrôler plus tard — le problème de la température. Cette température se trouvant limitée entre 3°C où l'hémolyse est nulle et 37°C (température du C.M.) où l'hémolyse est beaucoup trop rapide pour notre complexe, nous avons choisi 15°C, nous appuyant sur 2 données :

1°) Cette température nous permet d'employer un complexe hémolytique facile à confectionner, tout en donnant des réactions sensibles et spécifiques et une échelle de mesure assez étendue.

2°) La température de 15°C est relativement facile à obtenir puisque c'est celle que nous cherchons à maintenir dans nos habitations.

Notre réaction fixée à 15°C, nous avons fait varier la richesse en globules, les quantités et proportions de S.H. et de Cpl., avec des sérums très positifs et normaux, cherchant à déterminer le mélange donnant le plus de sensibilité à la méthode.

Nous ne donnerons de ces essais que la formule des quelques mélanges suivants faits comparativement avec sérums syphilitiques et normaux :

	E.P.	*Antigène* au 1/10e	*Sérum humain*	*Cpl.*	*S.H.*	*Globules*
1	0.40	0.30	0.20	0.35 à 1/10e	0.75 à 1/100e	1 cc. à 1/20e
2	0.40	0.30	0.20	0.35 à 1/5e	0.75 à 1/100e	1 cc. à 1/20e
3	0.40	0.30	0.20	0.35 à 1/10e	0.75 à 1/20e	1 cc. à 1/20e
4	0.40	0.30	0.20	0.35 à 1/5e	0.75 à 1/20e	1 cc. à 1/20e
5	0.40	0.30	0.20	0.35 à 1/10e	0.75 à 1/100e	1 cc. à 1/5e
6	0.40	0.30	0.20	0.35 à 1/5e	0.75 à 1/100e	1 cc. à 1/5e
7	0.40	0.30	0.20	0.35 à 1/10e	0.75 à 1/20e	1 cc. à 1/5e
8	0.40	0.30	0.20	0.35 à 1/5e	0.75 à 1/20e	1 cc. à 1/5e

Les résultats nous amenèrent à conclure qu'à 15°C le mélange le plus sensible (c'est-à-dire celui donnant le plus grand écart des courbes de vitesse d'hémolyse entre les sérums syphilitiques et normaux) comporte un excès de globules avec un complexe hémolytique fort (type n° 8).

Partant de ce mélange et employant 1 cc. de globules successivement au 1/5e, au 1/2e, purs, nous voyons qu'un grand excès de globules ne nuit pas à la sensibilité de la méthode si les opérations sont menées aseptiquement et les globules parfaitement lavés.

Nous avons voulu déterminer l'excès optimum des globules. Pour cela nous avons réalisé une série de tubes contenant chacun :

Cpl. à 1/5e : 0.70 cc.

S.H. à 1/20e : 1.50 cc. et :

Tubes N°	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*
Globules purs, en cc.	0.05	0.10	0.20	0.40	0.60	0.80	1	1.2
E.P., en cc.	3.75	3.70	3.60	3.40	3.20	3	2.80	2.60
Tubes N°	*9*	*10*	*11*	*12*	*13*	*14*	*15*	*16*
Globules purs, en cc.	1.4	1.6	1.7	1.9	2	2.2	2.4	3
E.P., en cc.	2.40	2.20	2.10	1.90	1.80	1.60	1.40	0.80

La vitesse d'hémolyse, aussi bien après 2 heures que 4 heures de réaction à 15°C, mis à part les tubes 1 et 2 où l'hémolyse est totale, 3 - 4 - 5 où elle est légèrement inférieure à celle des tubes suivants, est sensiblement la même pour les autres tubes.

Il semble donc qu'un excès de globules donne de la stabilité à la réaction ; afin cependant de n'avoir pas à manipuler de trop grosses quantités de globules, nous nous sommes arrêté à un mélange contenant la concentration en globules n° 13.

A partir de ce mélange :

E.P.	0.40
Antigène à 1/10e	0.30
Sérum humain	0.20
Cpl. à 1/5e	0.35
S.H. au 1/20e	0.75
Globules purs	1

nous avons vérifié l'énorme influence de la température tant avec un sérum syphilitique qu'avec un sérum négatif ; son abaissement diminue très rapidement la différence de vitesse d'hémolyse entre un sérum syphilitique et un sérum négatif ou un sérum physiologique.

Ainsi, prenant les sérums : physiologique et syphilitique du tableau 1, p. 21 et leur réaction avec le mélange ci-dessus formulé, à 10° et 15°C, nous voyons que la densité optique des liquides est:

Après.		*1 heure*	*2 heures*	*3 heures*
Pour le sérum +++.	à 10°	6	10	14
	à 15°	7	15	19
Pour le sérum artificiel	à 10°	13	27	34
	à 15°	133	157	160

L'élévation de la température amène un très important accroissement de la vitesse d'hémolyse.

Nous avons continué ces essais en posant comme variable le complexe hémolytique (S.H. - Cpl.), d'abord maintenant la température à 15°C, puis l'abaissant avec un système hémolytique plus fort que le système type, l'élevant avec un système moins fort. Aucun des mélanges essayés ne nous a donné de plus grands écarts entre les courbes représentatives des variations de densité optique d'un sérum normal et d'un sérum très positif, que le mélange décrit.

Il est évident, que le nombre des complexes étudiés est très faible auprès de ceux possibles en faisant varier : température, sensibilisatrice et Cpl., et que des complexes plus sensibles sont très probablement réalisables.

Dans tous les essais ci-dessus exposés nous avons arrêté l'hémolyse après le temps voulu de réaction, par une centrifugation de 2-3 minutes à 4.000 tours/minute.

Nous avions pensé arrêter l'hémolyse à la glacière, mais le froid n'arrête pas uniformément l'hémolyse et cet arrêt n'est pas assez brutal.

*
**

Le mélange dont nous avons exposé la formule ci-dessus, nous permettant, par exposition de quelques heures à 15°C, de séparer avec une marche suffisante un sérum syphilitique d'un sérum sain, nous nous proposions d'appliquer cette méthode au diagnostic de la syphilis, et d'essayer par elle un dosage des " anticorps " syphilitiques.

Les sangs humains que nous avons examinés nous furent fournis, d'une part par le Laboratoire d'Hygiène de la Ville de

Nantes, d'autre part, par les services de Monsieur le Professeur Y. Bureau, Chef de la Clinique Dermatologique de l'Hôtel-Dieu de Nantes.

Les sangs du Laboratoire d'Hygiène, la grosse majorité de ceux examinés, provenant du centre de surveillance de la prostitution, nous apportaient une majorité de résultats négatifs, et nous ne pouvions que très rarement nous procurer les renseignements cliniques des malades ; la Clinique Dermatologique nous permit de nous procurer des sangs de syphilitiques dont le Dr Bureau mit à notre disposition les fiches cliniques.

V. — CHOIX DES METHODES ANALYTIQUES DE COMPARAISON

Ne pouvant nous procurer les signes cliniques d'une grande partie des sérums x examinés, et étant donnée la nécessité pour l'établissement de notre méthode de connaître avec le maximum d'exactitude (sensibilité et spécificité) l'état des sangs examinés, il nous était nécessaire de comparer avec d'autres méthodes les résultats trouvés par la méthode en étude.

Cela peut être une erreur de comparer une méthode nouvelle à des méthodes anciennes pour juger la première ; il est possible en effet que les méthodes anciennes soient inférieures à la nouvelle ; mais il était nécessaire de procéder ainsi.

De même, l'usage habituel d'établir la perturbation d'un sérum par un ensemble de méthodes variées plutôt que par une seule considérée comme la meilleure de toutes, n'est logique que si les méthodes impliquées sont basées sur des principes différents les uns des autres, et si chacune d'elle est susceptible de mettre en évidence une perturbation qui peut échapper aux autres.

Le choix que nous avons fait parmi les méthodes d'examens sérologiques pour notre comparaison a été basé sur ces données, et nous nous sommes arrêté à l'ensemble suivant qui comprend, pour chaque groupe d'épreuve de B.W., les méthodes les plus utilisées.

I. — REACTIONS D'HEMOLYSE :

1°) Sérum frais : Hecht Rubinstein (R.)

2°) Sérum chauffé 30 minutes à 56°C; réaction opérant:
à 0° : Jacobsthal (J.)
à 37° : Calmette-Massol (C.M.)

II. — REACTIONS DE FLOCULATION :

1°) Sérum frais : R. d'opacification de Meinicke (M.T.R.)
ou R. de clarification de Meinicke (M.K.R. II)

2°) Sérum chauffé : Kahn Standard.

Nous avons pu aussi joindre à notre diagnostic sérologique pour le plus grand nombre des sérums Σ examinés, (les seuls qui donnent lieu à une évaluation quantitative), les chiffres du photomètre de Vernes (V.), pris par le Professeur B. Ballet et qui nous furent communiqués par les services du Professeur Y. Bureau.

Nous nous proposions, quand la quantité de sérum ne serait pas suffisante, ce qui arrivait souvent étant données les grandes quantités de sérum nécessitées par nos essais, de donner la préférence à l'ensemble K. - R. - C.M.

Quelques explications du choix et de l'emploi que nous avons fait de ces méthodes nous semblent nécessaires.

I. — Hecht - Rubinstein.

Nous rappellerons les mots en lesquels Demanche *(20)* résume les qualités des méthodes d'hémolyse au sérum frais : « plus simples, plus sensibles (surtout plus précocement sensibles), plus résistantes au traitement, mais moins spécifiques ».

L'ennui de ces méthodes est que, vues les grandes variations des propriétés hémolytiques du sérum humain, il est nécessaire de se renseigner sur le pouvoir hémolytique de chacun des sérums étudiés, afin d'éviter d'attribuer à une absence d'hémolyse, dûe à la pauvreté d'un sérum en sensibilisatrice hémolytique naturelle, la positivité d'un sérum. Pour cela, alors que l'indice hémolytique de Weinberg est très long, le Rubinstein « donne dans une même opération la mesure de la force hémolytique du sérum et le résultat de la réaction » *(60)*, aussi l'avons-nous choisi.

Nous signalerons que, pour suppléer à l'insuffisance toujours possible de complément ou de sensibilisatrice, nous ajoutons aux 3 séries de tubes en réaction dans le R. type *(79)* (contenant 0,1 - 0,2 - 0,3 de globules à 5 %), une série contenant 0,05 de globules. Ces tubes nous permettront de voir si le sérum examiné est totalement privé de sensibilisatrice ou de complément, ou s'il en possède très peu, et dans ce cas, de nous faire une idée sur son signe sérologique.

II. — Jacobsthal.

Jacobsthal (1910) a estimé que la température optima pour la fixation du complément était 0°, la sensibilité de la réaction serait accrue par un procédé la pratiquant à cette température, et les réactions non spécifiques empêchées.

Leredde et Rubinstein (1914), étudiant l'influence de la température sur la réaction de fixation, ont montré qu' « il est très utile de pratiquer la réaction de fixation aussi bien à la température de l'étuve qu'à celle de la glacière. Dans la majorité des cas, la réaction à froid donne une plus grande valeur aux réactions faibles obtenues à chaud ; elle permet d'autre part de poser le diagnostic de syphilis dans les cas où le W. à chaud est souvent négatif » *(50)*.

En 1923, B. Ballet et Rubinstein *(2)* étudiant le J. comparativement aux B.W. et Hecht, ont montré que cette première réaction, si elle n' « est pas plus précocement sensible, est plus longtemps sensible » que les deux autres réactions.

Le schéma où ils ont résumé leur étude est resté classique. Depuis, la sensibilité du J. n'a pas été mise en doute et c'est cette réaction, qui, de toutes les réactions de fixation du complément a donné, lors de la Conférence sérologique de Copenhague en 1928, la proportion la plus grande de résultats positifs dans la syphilis; il n'en est pas ainsi de sa spécificité puisque c'est elle aussi qui, en dehors de la syphilis, a donné le plus de résultats non spécifiques.

Nous avons dit le choix de la température de 15°C pour notre réaction (p. 44) ; et nous avons voulu joindre à nos examens sérologiques le J., car, dans notre réaction, la fixation (comme l'hémolyse d'ailleurs) se faisant à une température prise entre celle du J. et celle du C.M., nous aurions vivement désiré voir ce qu'aurait donné notre méthode dans le cas, qui ne s'est pas présenté, d'un J. persistant positif alors que le C.M. est négatif.

— L'explication de la plus grande sensibilité du J. ?

— Harry Eagle *(29)* donne la double explication suivante:

1°) Les protéïnes sont adsorbées par les complexes lipoïdes-réagines et forment ainsi des pellicules qui empêchent le complément de se fixer. Cette adsorption des protéïnes est moins énergique à des températures basses qu'à 37°.

2°) Le temps de contact avec le Cpl. est plus prolongé à la glacière qu'à l'étuve.

Il nous est impossible de juger les premiers faits énoncés ; quand aux seconds, nous avons pu voir qu'en maintenant le même temps de contact (1 heure) : à la glacière pour le J., à l'étuve pour le C.M. (ce que d'ailleurs nous faisons dans nos réactions) les résultats sont sensiblement les mêmes qu'en maintenant le J. à la glacière 1 h. 1/4 (comme LEREDDE-RUBINSTEIN *(50)*) et même 1 heure et demie comme le font d'autres auteurs. La lecture se faisant, pour le J., après 1 heure de contact avec les globules sensibilisés à 37°C ; pour le C.M. après 1/2 heure.

Nous pensons, et c'est l'idée exprimée par LASSEUR et SPILLMANN *(47)* montrant l'importance de la température sur les réactions antigène-anticorps faites avec des complexes faibles, que, la première phase se faisant à 0°C dans le J. et à 37°C dans le C.M., la deuxième phase à 37°C dans les deux techniques, l'hémolyse se trouve ralentie dans le J. par rapport à celle du C.M. du fait que le mélange met un certain temps à passer de 0°C à 37°C, et que ce ralentissement de l'hémolyse dû à l'abaissement de la température de réaction influe sur la sensibilité de la méthode, sans toutefois expliquer entièrement le phénomène.

III. — Calmette et Massol.

Cette technique constitue, d'après DEMANCHE, un progrès indéniable au point de vue augmentation de la sensibilité de la R. de B.W. ; c'est, dit-il, « la plus délicate et la plus précise des réactions d'hémolyse » *(20)* ; c'est à elle que va sa préférence.

Nous employerons, pour les titrages préliminaires au C.M., ainsi que pour la réaction, les dispositifs décrits par MEERSEMANN *(60)*.

On sait qu'il est possible de faire cette réaction avec plus ou moins de sensibilité : la lecture de la limite d'hémolyse, lors de la vérification du titre du sérum hémolytique, puis du titrage du Cpl., étant délicate. Nous avons toujours employé la quantité minima de Cpl., donnant ainsi à la méthode le maximum de sensibilité.

Pour les réactions de R - J - C.M., nous avons employé un antigène P. de Bordet-Ruelens préparé par nos soins (cf. p. 124).

IV. — Meinicke.

Nous nous proposions de joindre à notre diagnostic sérologique, une réaction de Meinicke au sérum frais. Alors que la plupart des auteurs inactivent le sérum humain par chauffage avant leurs réactions de floculation, les nouvelles réactions de Meinicke emploient le sérum frais.

Or, il a été établi que la présence du complément s'oppose à la floculation, qu'il aurait un pouvoir décoagulant et dispersif : l'inactivation dans ce cas rendrait la réaction moins spécifique (mais peut-être plus sensible).

Meinicke qui, depuis 1917, a fait de très nombreux travaux sérologiques et a présenté 3 réactions successives de floculation au sérum chauffé, est revenu dans sa réaction d'opacification (M.T.R. 1926), puis dans ses 3 réactions successives d'éclaircissement (M.K.R. : 1 - 1 bis - 2) au sérum frais : le chauffage à 56° produirait, d'après lui, un renforcement de la réaction risquant de donner des résultats positifs non spécifiques.

Nous avions cru dès lors intéressant de joindre à notre étude l'une ou l'autre de ces réactions.

1°) M.T.R. :

Pour cette réaction, les avis sont très partagés : de nombreux auteurs ont signalé des résultats positifs non spécifiques..... 9 résultats non spécifiques à Copenhague en 1928 laissent la M.T.R. loin derrière les réactions de Müller et de Kahn ; — alors que Le Chuiton (1930) conclut d'une étude de cette réaction qu' « à condition d'opérer sur des sérums de malades n'ayant pas subi de choc colloïdal par injection de vaccin, et non paludéens, la R. de Meinicke pratiquée dans des conditions normales ne donne pas de réaction positive non spécifique », il signale cependant que « des conditions physiques déterminées sont nécessaires à la bonne marche de la réaction : lumière, pression atmosphérique normale, température au-delà de 25°C » *(48)*, — et que Demanche et L. Guenot *(20)* (Juillet 1928) sur 700 cas n'ont pas constaté de réactions non spécifiques...

D'où peuvent venir ces divergences d'opinion ?

Il est un fait signalé par Demanche que : « la valeur des méthodes varie en partie avec les sérums auxquels on les applique et ce fait paradoxal s'explique sans doute par les variations individuelles de l'état physico-chimique des sérums » *(20)*.... ceci

ne jouerait-il pas davantage dans une réaction de floculation se faisant en présence du Cpl., mélange de lipoïdes encore mal connus sur lequel nous remarquons que les trois facteurs physiques incriminés par Le Chuiton ont une action encore bien confuse (cf. p. 113), surtout en présence d'un antigène P. si délicat...

Nous avons, au début de ce travail, pratiqué sur une cinquantaine de sérums, la M.T.R. utilisant le « Tolu antigène pour le sérodiagnostic de la syphilis : réaction d'opacification de Meinicke » fourni par la Biothérapie.

Cette réaction dont nous reconnaissons la grande sensibilité, nous a donné une proportion élevée de résultats non spécifiques ; à notre avis elle est un peu comparable à la méthode de Hecht au sérum frais : plus simple, plus sensible, mais moins spécifique... ce serait une sorte de " Hecht " de la floculation...

Nous extrayons à ce sujet du dossier constitué au laboratoire d'Hygiène par une expérimentation de cette méthode de plusieurs années les quelques exemples suivants :

FEMME B.-J. :

Toutes réactions négatives au 23 septembre 1933.

Le 30 novembre 1933 :

R. : — — +
C.M. : — — —
M.T.R. : — — +

Cette femme aurait eu un traitement en septembre 1933.

Remise au traitement — ne supportant pas l'arsénobenzol — est mise au bismuth du 12 décembre 1933 au 27 février 1934.

Au 21 mars 1934 :

R : — — —
C.M. : — — —
K : — — —
M.T.R. : + + +

L'avis du médecin est d'interpréter la réaction comme négative, pour plus de certitude, il remet au traitement.

FEMME M.-M. :

Dit n'avoir jamais eu la syphilis (comme le disent la plupart des prostituées). Prise de sang le 1er octobre 1931 : négative.

Le 11 février 1932 :

R : — — —
C.M. : — — —
M.T.R. : — + +

Mise au traitement de réactivation par injection intraveineuse de novarsenobenzol.

Nouvelle prise de sang le 26 mai 1932 :

R : — — —
C.M. : — — —
M.T.R. : — — +

D'après le médecin traitant, doit être considérée comme négative, sera soumise à une nouvelle prise de sang dans un mois.

FEMME L.-Y :

Prétend n'avoir jamais eu la syphilis ; cependant, aurait eu une prise de sang il y a un mois 1/2. ?

Prise de sang le 27 avril 1933 :

R : — — —
C.M. : — — —
M.T.R. : + + +

Part de Nantes le 30 avril 1933.

Si cette femme était restée à Nantes, il aurait été fait une réactivation.

On comprendra par ces exemples types comme il est délicat, dans un service de surveillance de la prostitution où les malades sont extrêmement mobiles, de pratiquer une réaction dont la spécificité paraît très inférieure à la sensibilité.

A ce sujet on regrettera le manque total de standardisation des méthodes sérologiques employées dans les différents laboratoires, qui fait qu'un malade passant d'une ville à l'autre ne puisse être examiné selon les mêmes techniques faites avec les mêmes constituants.

Il est à souhaiter que cela ne soit pas oublié dans la loi concernant la prophylaxie des maladies vénériennes dont l'actuel projet Sellier se propose de règlementer les détails et demande, avec combien d'à-propos et de justesse, que « les seuls laboratoires autorisés à effectuer les examens sérologiques nécessaires pour le séro-diagnostic de la syphilis, soient ceux qui sont agréés par le Ministère de la Santé Publique » (article 28).

On est en droit d'espérer que, pour ces laboratoires enfin surveillés, et s'écartant de l'erreur si bien définie par Charles NICOLLE *(66)* de tous « procédés systématiques », on propose à l'attention, par des mises au point critiques, les meilleures méthodes de séro-diagnostic, que l'on condamne les méthodes par trop simplifiées, périmées ou inexactes, et que des vérifications soient faites de l'exactitude de certains examens.

2°) M.K.R. II :

Ayant abandonné la M.T.R., nous avons pratiqué la troisième réaction d'éclaircissement de Meinicke : M.K.R. II (technique 1932) qui constitue actuellement la réaction de Meinicke.

Nous avons employé « L'Original Standard Extrakt für die neue Meinicke Klärungs Reaktion M. K. R. II » contrôlé par Meinicke et en vente à la pharmacie Adler de Hagen (Westphalie).

Cette réaction jouirait d'après Née, « de par sa grande sensibilité et sa précocité, d'une valeur diagnostique importante ; très sensible elle peut se montrer partiellement positive dans les infections non spécifiques, mais le coefficient d'erreur est faible et n'entache pas sa spécificité » *(64)*. — DELAS et BARONET *(19)* signalent de nombreux cas de résultats non spécifiques avec cette réaction chez des tuberculeux, des typhiques ; ils auraient obtenu 72 % de résultats positifs chez les paludéens, alors que le Kahn ne leur en donnait que 45 %.

Nous avons vérifié, dans nos examens, la sensibilité extrême de cette réaction ; mais avons obtenu quelques réactions légèrement positives, non spécifiques.

De plus, la M. K. R. II nous a presque toujours donné des résultats très voisins du Kahn. Aussi, pratiquant cette réaction beaucoup plus rapide et plus élégante sur tous les sérums nous n'avons joint la M. K. R. II que lorsque nous avions à notre disposition de grosses quantités de sérum, ou, selon la recommandation de R. DEMANCHE *(21)*, dans les cas douteux et difficiles, afin de confirmer les résultats du Kahn auquel cet auteur continue d'accorder sa préférence.

V. — Kahn Standard :

A la conférence de Copenhague de 1928, où les principales méthodes sérologiques ont été pratiquées par leurs propres auteurs, la réaction du Docteur KAHN, qui, au point de vue sensibi-

lité, arrivait en tête des diverses réactions presqu'à égalité avec la réaction de Müller, n'a pas donné un seul résultat non spécifique.

Pour Demanche, le K. « apparaît comme une des meilleures méthodes de séro-diagnostic de la syphilis, aussi bien pour sa spécificité que pour sa sensibilité » *(20)*, elle se recommande de plus, par sa rapidité et la simplicité de sa technique... aussi la Commission d'enquête de la S. D. N., après les réunions sérologiques de Copenhague et de Montevideo, a remplacé, dans la triade de réactions qu'elle propose, l'épreuve de Hecht par le Kahn, ce qui semble sévère pour le Hecht, réaction simple et qui donne de très bons résultats.

De plus, le pouvoir " antihémolytique " du sérum n'entrave pas la réaction, c'est là un avantage appréciable et nous signalons par exemple le sérum 13 (p. 67) où ce fut la seule réaction donnant un résultat.

Le seul inconvénient de cette méthode si sûre, est l'agitation mécanique qui demande un appareil onéreux (2.000 francs) pour un petit laboratoire.

Cependant, avec de l'entraînement, en prenant la précaution de limiter le déplacement des supports à 3-4 cm., cette agitation peut se faire à la main avec une exactitude suffisante, durant trois minutes à raison de 275 à 285 oscillations par minute. Dans le cas de fatigue de la main on peut, d'après Demanche *(20)* et Brousse *(12)*, diviser le temps d'agitation en trois périodes d'une minute séparées par quelques secondes de repos.

Tous nos examens ont été faits par agitation manuelle. Nous avons employé un antigène P. fourni par la Biothérapie, antigène standardisé conformément à l'étalon de Kahn, qui a formulé dans son ouvrage " The Kahn test, a pratical guide ", la méthode de préparation de son antigène et sa standardisation par titrage s'il y a lieu *(42)*.

Nous avons adopté la lecture par grossissement au moyen du miroir concave du microscope, et avons toujours fait cette lecture à la lumière du jour.

VI. — Vernes.

Comme nous le disions p. 50 cette réaction n'a pas été faite par nous, peu de laboratoires possédant en effet le matériel très onéreux nécessaire à cette réaction (mélangeur : 3.000 francs —

photomètre : 10.000 francs, bain-marie à 25°...). Nous avons cependant tenu à joindre à nos diagnostics sérologiques le chiffre de cette réaction, la seule qui soit vraiment actuellement une méthode quantitative et prétende donner une séro-mesure de l'infection syphilitique.

Le Vernes « abandonnant les éléments biologiques d'appréciation dont se sert le Wassermann », fait passer l'opération « du domaine de la biologie dans celui de la physique », assurant ainsi l'uniformité des résultats pour tous les laboratoires qui possèdent l'outillage nécessaire *(49)*.

Notre idée se rapproche beaucoup de la réalisation de Vernes, faire que la réaction de W., malgré son substrat biologique, ait une mesure d'ordre physique par là exacte et précise, soustraire l'observation sérologique à toute influence extérieure.

L'argument masse des méthodes de floculation est que toutes les réactions de W. ne sont que des réactions de floculation, où la floculation n'est lisible qu'indirectement grâce à des phénomènes d'hémolyse, et que cette complication rend la méthode très délicate et passible d'erreurs.

A ce sujet on doit remarquer que souvent dans le cas de réactions moyennement positives, les réactions d'hémolyse et les réactions de floculation forment deux groupes distincts ; ainsi Maupin *(57)* signale que le K. et le V. se groupent volontiers pour donner des résultats opposés à ceux du Hecht et du B. W. De plus, cas très rare il est vrai, chez certains malades on rencontre des réactions de floculation positives avec réactions d'hémolyse négatives... alors que chez d'autres, seules les réactions d'hémolyse sont positives...

Tout récemment Dujarric de la Rivière et Kossovitch *(28)*, étudiant l'action de la température et de l'adsorption sur les éléments qui déterminent les réactions de floculation et de déviation du complément, ont montré qu'il existe une nette différence entre les substances qui, dans le sérum, conditionnent la floculation et la réaction de B. W.

D'autre part, de l'avis de beaucoup de sérologistes, la réaction de Vernes, qui rend pour suivre le traitement de la syphilis des services inégalés, a une sensibilité excessive et parfois dangereuse aux influences thérapeutiques ; et d'après Demanche et

Guenot *(23)* « sa valeur diagnostique est nettement inférieure à celle des méthodes classiques, principalement des méthodes au sérum chauffé ».

Il ne semble donc pas prudent de baser un examen sérologique sur une seule méthode : fut-elle la méthode quantitative de Vernes, et on voit le gros intérêt d'essayer d'établir, à partir des méthodes d'hémolyse, une méthode quantitative ; et de voir si celle-ci, ne pourrait pas, parallèlement au Vernes, se complétant l'une l'autre, aider au diagnostic et au traitement de la syphilis.

Nous rappellerons que Vernes, toujours à la recherche d'une plus grande sensiblité de sa méthode, et tant est difficile à fixer un seuil en biologie, a changé successivement en 1923, Mars 1924, puis Mai 1924, la notation de sa méthode, adoptant alors celle proposée par M. Brocq et que nous reproduisons pour faciliter la lecture des résultats présentés plus loin :

0	:	Sérum normal,
1-2	:	Sérum normal, mais un peu suspect
3-4	:	Probabilité en faveur de la syphilis 25 %
5-6	:	» » » 50 %
7-11	:	» » » 1.999/2.000
12-18	:	» » » 9.999/10.000
19-27	:	» » » 649.999/650.000

28 et au-dessus : syphilis toujours certaine.

Notation des résultats :

Un des ennuis des méthodes d'hémolyse est la variété de la signification que l'on donne aux divers degrés de l'hémolyse ; une autre cause d'erreur réside dans la diversité des notations employées.

Pour rendre plus facile la lecture des résultats des méthodes de contrôle, nous avons noté, pour toutes les méthodes, les résultats par des + et des —, allant de + + + positivité complète à — — — négativité.

Pour les méthodes d'hémolyse : R. - C.M. - J. — Ch. Craig *(17)* ayant formulé, s'appuyant sur 35.000 R. de B. W., qu'un diagnostic de syphilis ne doit jamais se baser sur une réaction avec plus de 50 % d'hémolyse — nous apprécions uniquement entre un tube de réaction et son tube témoin, trois états d'hémolyse que nous notons :

+ : hémolyse du témoin sans hémolyse du tube réaction.

± : hémolyse du témoin avec 1/2 hémolyse du tube réaction.

— : hémolyse des tubes témoin et réaction.

Lorsque les tubes témoins ne sont pas tous hémolysés (cela doit toujours être le cas, sinon la réaction est mal faite) nous faisons la moyenne proportionnelle des résultats obtenus et les exprimons par les six systèmes à notre disposition ; que nous n'avons pas voulu, étant donné l'usage généralement établi des signes, désigner par la méthode plus simple des chiffres :

+++	++±	++—	+±—	+——	±——	———
6	5	4	3	2	1	0

Pour les méthodes de floculation nous employons les mêmes signes pour la notation.

Nous posions en principe de faire les réactions de contrôle et la réaction en essai avec les sérums prélevés depuis environ 48 heures et avec les mêmes : complément, sérum hémolytique, globules, eau physiologique, et pour les réactions d'hémolyse un antigène P. de Bordet Ruelens dépourvu de pouvoir anticomplémentaire. Dans un prochain chapitre nous examinons chacun de ces constituants de la méthode (p. 109).

VI. — ETABLISSEMENT DE LA METHODE

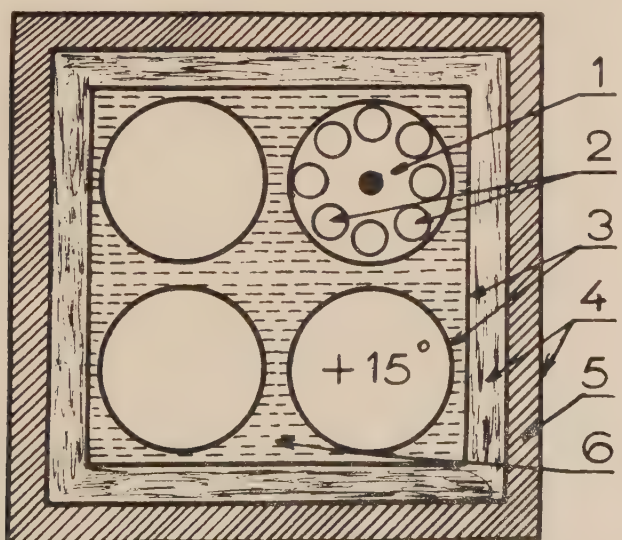
I. - Première Technique suivie :

Dans ce paragraphe nous exposerons la première technique suivie et comment nous fûmes amené à l'abandonner.

Les réactions de contrôle étant effectuées ; le sérum hémolytique amené au titre voulu, l'eau physiologique, les dilutions de complément au 1/5 et d'antigène P. au 1/10, les globules purs exempts de toute hémolyse, les sérums humains inactivés : en un mot tous les constituants du mélange, sont amenés à 15° C.

Les réactifs et sérums sanguins sont manipulés aseptiquement et toute la verrerie est stérile.

Nous avons réalisé un thermostat très simple en employant une boîte, genre de boîte à prélèvement d'eau, que nous avons



(1) Thermomètre. — (2) Tube à hémolyse. — (3) Zinc. — (4) Feutre. (5) Bois. — (6) Eau.

recouverte extérieurement et intérieurement de feutre (voir schéma) : l'eau y étant amenée à 15°C, l'atmosphère s'y maintient facilement plusieurs heures à 15°C d'autant plus que dans un laboratoire la température ne s'écarte guère que de 5 à 10 degrés de 15°C. Un thermomètre lisible de l'extérieur permet de vérifier la température.

Lorsque les divers constituants du mélange et le thermostat sont à 15°C, on répartit les réactifs dans l'ordre indiqué, chacun avec sa pipette stérile, dans des tubes placés dans l'atmosphère du thermostat. Les tubes sont agités après chaque addition.

Dans un tube, le sérum humain x est remplacé par de l'eau physiologique ; c'est le témoin : l'hémolyse n'y est fonction que du système hémolytique.

Pour établir le temps optimum de la mesure donnant le maximum de sensibilité à la méthode, des mesures d'hémolyse furent faites toutes les 30 minutes (v. tableaux I, II, III). Une mesure au temps 0 donnait la densité optique au départ ; celle-ci pouvant varier légèrement avec l'hémolyse toujours possible des réactifs employés.

Plus tard le temps optimum de réaction ayant été fixé à 2 heures, nous nous contentons d'une mesure après 2 heures d'exposition à 15° C et d'une autre de contrôle après 3 heures.

A chaque mesure une partie aliquote du contenu préalablement agité des tubes en réaction est versée dans de petits tubes à hémolyse stériles, gradués et numérotés. On les refroidit quelques instants à la glacière pour éviter un échauffement possible, on remet les globules en suspension par agitation et les centrifuge 2-3 minutes à 4.000 tours-seconde.

Le liquide clair surnageant les globules après centrifugation est décanté dans la cuve de néphélocolorimètre et la mesure qui demande quelques secondes pour chaque sérum en réaction est effectuée aussitôt sous une épaisseur de 10 mm.

Après chaque mesure la cuve est rincée à l'eau distillée.

Nous donnerons deux séries types des examens faits à ce stade de notre méthode. Dans la première nous exposerons les calculs nécessaires.

SERIE I :

Dans cette série les sangs sont examinés 48 heures après leur prélèvement.

Le complément est formé du mélange des sérums de trois cobayes mâles à jeun, sérums prélevés 4 heures avant la réaction.

Les résultats des méthodes de contrôle sont joints au *tableau III* (p. 64).

La densité optique du liquide surnageant les globules au temps 0, (— les sérums humains, le complément, le sérum hémolytique, n'accusant aucun laquage), était uniformément pour le témoin et les tubes de réaction, donnée à la cellule par :

Plot : 100 — Déviation D : 57 ——> densité optique en 1/100 de densité. d : 326

Après 30 minutes de réaction à 15°C il vient :

SÉRUM	N°	PLOT ———	D ———>	d d'où	Δ: *Variation de* d :
B. M.[1]	1	20	21	213	326 — 213 = 113
D. G.	2	20	18	206	Δ = 120
G. E.	3	20	52	243	Δ = 83
L. A.	4	20	55	254	Δ = 72
P. L.	5	20	40	240	Δ = 86
S. M.	6	20	52	243	Δ = 83
T. J.	7	20	18	206	Δ = 120
L. M.	8	20	22	215	Δ = 111
B. M.[2]	9	5	51	192	Δ = 134
X		100	56	325	Δ = 1
Témoin	10	5	36	176	Δ = 150

Pour les autres temps de la réaction, nous donnerons simplement le chiffre des variations de densité optique Δ :

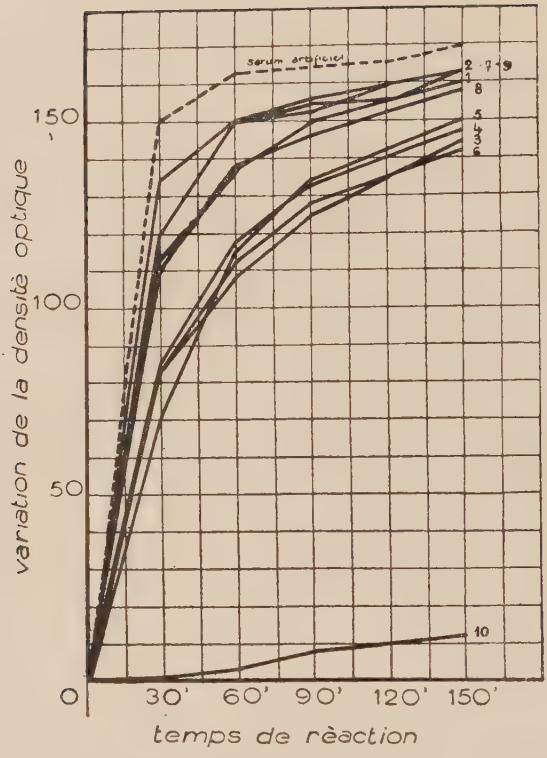


TABLEAU III.

Sérums		Méthodes de Contrôle			Rapport méthode après 2 h. de réaction
		R.	C. M.	K.	
1	B.M.[1]	— — —	— — —	— — —	6
2	D.G.	— — —	— — —	— — —	4
3	G.E.	— — +	— — ±	— — +	18
4	L.A.	— — —	— — —	— — —	14
5	P.L.	— — —	— — —	— — —	15
6	S.M.	— — —	— — —	— — —	18
7	T.J.	— — —	— — —	— — —	4
8	L.M.	— — —	— — —	— — —	8
9	B.M.[2]	— — —	— — —	— — —	6
10	X	+ + +	+ + +	+ + +	93

Temps de contact : à 15°C

SÉRUMS	N°	60 Minutes	90 M.	120 M.	150 M.
B. M.[1]	1	137	150	155	160
D. G.	2	150	156	159	163
G. E.	3	108	125	135	142
L. A.	4	115	134	142	150
P. L.	5	118	133	140	147
S. M.	6	113	128	135	144
T. J.	7	149	152	159	163
L. M.	8	138	146	152	158
B. M.[2]	9	150	154	155	163
X	10	3	8	10	12
Témoin		163	164	166	170

Pour résumer ces séries de chiffres, nous les portons sur un graphique qui nous dispensera dans les exposés suivants de cette suite fastidieuse de nombres ; nous portons en abcisses les temps de réaction et en ordonnées les variations de densité optique. Le *tableau III* (p. 64) donne les courbes représentatives des variations de densité optique des sérums examinés ci-dessus dans le temps.

Pour exprimer la concentration C en anticorps syphilitiques des sérums examinés, nous avons adopté le rapport multiplié par 100, de la différence des variations de densité optique témoin (Δ^T) - sérum examiné (Δ) sur la variation de densité optique du témoin (Δ^T), (c'est-à-dire la variation de densité relative) $C = \frac{\Delta^T - \Delta}{\Delta^T} \times 100$

Nous comptions donner ainsi à la force en anticorps syphilitiques du sérum examiné, une gamme de positivité croissante de 0 à 100.

Le calcul du rapport caractéristique du sérum est donc très simple ; ainsi pour les sérums de la série I au temps : 120 minutes qui nous a semblé optimum, ce rapport était :

B. M.[1] $= \frac{166 - 155}{166} \times 100 = 6$

G. E. $= \frac{166 - 135}{166} \times 100 = 18$

P. L. $= \frac{166 - 140}{166} \times 100 = 15$

T. J. $= \frac{166 - 159}{166} \times 100 = 4$

B. M.[2] $= 6$

L. A. $= 14$

L. M. $= 8$

D. G. $= 4$

S. M. $= 18$

X $= \frac{166 - 10}{166} \times 100 = 93$

Les chiffres donnés par les sérums négatifs sont donc tous compris entre + 4 et + 18 ; alors que le sérum positif examiné (provenant d'une syphilis secondaire non traitée) donne 93.

SERIE II :

Cette série comportait plusieurs sérums très importants au point de vue des modifications à apporter à la technique exposée ; nous ne donnerons, pour ne pas charger inutilement le graphique, que les mesures aux temps 60 et 120 minutes (*Tableau IV :* première partie).

Nous donnerons quelques renseignements sur les sérums typiques.

Sérum 8 : très opalescent — absence de signes cliniques.

Sérum 10 : femme 68 ans — entrée il y a 2 mois pour syphilis tertiaire avec localisation cardiaque. Traitée depuis lors au Cyanure de Mercure. Cette prise de sang fut faite après trois semaines de repos, au début d'une nouvelle série de Cyanure.

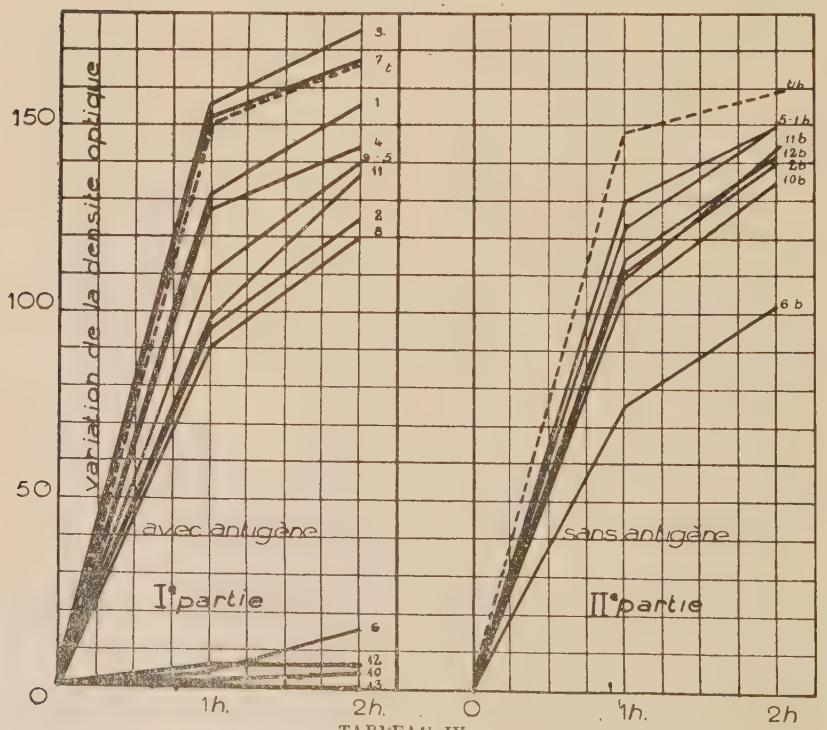


TABLEAU IV.

Sérums	Méthodes de Contrôle					Ire Méthode après 2 h.	2e Méthode après 2 h.
	H.	C. M.	J.	K.	V		
1	— — —	— — —	— — —	— — —		6	— 3
2	— — —	— — —	— — —	— — —		24	10
3	— — —	— — —		— — —		— 4	
4	— — —	— — —		— — —		13	
5	— — —	— — —		— — —		15	6
6	man. part. Cpl	+ ± —	+ + —	— — —		91	86
7	— — —	— — —		— — —		0	
8	— — —	— — —	— — —	— — —		27	
9	— — —	— — —		— — —		15	
10	+ + +	+ + ±	+ + ±	— — —	0	97	97
11	— + +	— — —		— — —		17	4
12	+ + +	+ + +		+ + +		96	95
13	manq. tot. Cpl	?		+ + +		100	

Sérum 11 : Syphilis tertiaire chez une femme de 38 ans, dépistée lors d'un accouchement il y a 2 ans. Soignée depuis lors au Sulfarsenol et Bivatol. Cette prise de sang date du début d'une série de Bivatol après un arrêt de 2 mois dans le traitement bismuthique.

Sérum 13 : C'est le sang d'un vieillard P. G. traité sans modifications sérologiques depuis plusieurs années. Ce sang, de couleur violacée, ne s'est pas coagulé; centrifugé très longuement à grande vitesse, il a donné un sérum opalescent clair. Le Kahn était positif à l'extrême. Le Rubinstein impossible, il n'y avait hémolyse ni dans les tubes de réaction, ni dans les tubes témoins. Ce que l'on traduit ordinairement en disant que le sérum " manque de complément " et qui peut signifier aussi : pouvoir anticomplémentaire * du sérum, manque d'hémolysine anti-mouton ou pouvoir antihémolytique. Au C. M. aussi bien les tubes de réaction que les tubes témoins n'avaient aucune hémolyse. Nous n'avons pu, étant donnée la

* Nous disons ici anticomplémentaire, non pour désigner l'absence de cette substance nécessaire à l'hémolyse que l'on appelle complément, mais pour désigner un pouvoir s'opposant à l'action du complément de contribuer à l'hémolyse, c'est-à-dire donnant au complément une valeur négative lui permettant de neutraliser un système hémolytique complet variable.

faible quantité de sérum à notre disposition, voir quelle était la substance qui, dans cette réaction, empêchait l'hémolyse : substance anti-hémolytique, anticomplémentaire ou leur ensemble ; à moins que ce sérum ne possédât ce pouvoir agglutinant sur les globules de mouton, très exceptionnel, signalé par DEMANCHE *(22)* et qui entrave la réaction. Il semble qu'une grande augmentation du complexe hémolytique devait rendre la réaction possible.

Le complément employé dans cette série de réactions était formé des sérums de trois cobayes mâles, à jeun, conservés 12 h. à + 2° C sur le caillot et centrifugés au moment de l'emploi.

INTERPRETATION des RESULTATS FOURNIS par ces DEUX SERIES d'EXAMENS :

SÉRIE I :

Nous avons présenté cette série pour montrer comment il nous a fallu près de 100 examens de sang pour nous apercevoir que la technique présentée était inacceptable.

En effet, dans une série comme celle-ci les résultats sont acceptables : nous signalerons cependant le sérum G. E. (n° 3) (cf. *tableau III*, p. 64) qui donne à la méthode un chiffre qui n'est pas plus élevé que celui d'un sérum négatif tel S. M. (n° 6).

De plusieurs séries qu'il nous paraît inutile de reproduire tant elles ressemblent à la série I, 6 résultats n'étaient pas acceptables ; nous avons cru que ces échecs tenaient à des erreurs opératoires ou au principe même de la méthode, d'autant plus que nous ne pouvions doubler nos réactions du fait des quantités de sérum nécessitées par ces essais comportant une mesure toutes les 30 minutes.

La certitude contraire nous fut donnée par la série II, que nous allons examiner plus spécialement car elle résume les problèmes que nous présentèrent nos examens de sang à ce stade de notre méthode.

SÉRIE II :

Deux points demandent explication :

1°) Le sérum 6 apparaît comme très positif à notre méthode alors que les méthodes classiques nous le montrent moyennement positif. Le 13 n'accuse aucune hémolyse après 2 heures de réaction.

En consultant les résultats des méthodes classiques, il apparaît que les sérums qui donnent des résultats discutables " manquent de complément " au R., c'est-à-dire qu'il y a en eux une puissance autre que les anticorps syphilitiques, qui s'oppose à l'hémolyse.

Le sérum 6 était anti-hémolytique ; le cas n'est pas rare et beaucoup de sérums exagèrent ce pouvoir lors de leur chauffage à 56° C.

Quant au sérum 13 — d'ailleurs sérum très positif — nous avons tout lieu de croire, étant donné le très grand excès de sensibilisatrice anti-mouton entrant dans notre réaction, que nous étions en présence d'un sérum à vrai pouvoir anticomplémentaire ou à pouvoir empêchant l'hémolyse des globules de mouton : cas très rares que la pratique des sérodiagnostics fait évaluer inférieurs à 1 pour 1.000. C'est le seul sérum ayant cette propriété que nous avons rencontré durant notre travail ; nous n'avons pu nous le reprocurer dans la suite.

Il est évident que dans l'un et l'autre de ces cas, le degré de l'hémolyse observé dans la réaction n'est plus uniquement fonction de la teneur en anticorps syphilitiques, ce qui amènerait des erreurs, même dans une réaction qualitative faite avec ce principe, et détruirait tout l'intérêt de notre méthode qui tend à être quantitative et pour laquelle tout retard à l'hémolyse non spécifique est une cause d'erreur.

2°) Il y a des sérums négatifs qui donnent une hémolyse supérieure à celle donnée par le témoin ; d'autres une hémolyse inférieure.

Ceci doit s'expliquer par la charge en sensibilisatrice anti-mouton des sérums, plus ou moins grande positivement ou négativement : charge variant d'ailleurs d'une façon qui échappe à toute règle avec chaque sérum, et chez chacun d'eux, avec l'altération causée par le vieillissement et le chauffage.

Il apparaît dès lors que, partant d'une méthode aux sérums inactivés par chauffage, la seule manière vraiment exacte de doser les anticorps syphilitiques par appréciation de la vitesse d'hémolyse, serait de titrer, pour chaque sérum x, la puissance hémolytique positive ou négative du sérum, et d'amener tous les sérums à examiner à posséder les mêmes doses de sensibilisatrice anti-mouton et de complément que le témoin ; le retard à l'hémolyse

dans les tubes contenant du sérum syphilitique serait alors fonction seulement du pouvoir anticorps syphilitique de ces sérums.

Mais cette méhode serait tellement longue qu'elle perd tout intérêt pratique.

Nous avons pensé tourner la dificulté, et obtenir une approximation suffisante, en faisant pour chaque sérum x : 1° un témoin sans antigène P. dont la vitesse d'hémolyse serait due aux puissances hémolytiques propres du sérum, augmentées des puissances hémolytiques amenées par le complexe hémolytique introduit ; 2° un tube de réaction dont l'hémolyse serait régie par ces mêmes puissances hémolytiques mais dont la vitesse d'hémolyse serait diminuée du retard à l'hémolyse apporté par la fixation due aux anticorps syphilitiques.

Pour chaque sérum nous nous proposions donc de mettre en réaction :

a) le tube témoin — où l'antigène P. serait remplacé par de l'eau physiologique — dont la vitesse d'hémolyse serait fonction de l'ensemble hémolytique ;

b) le tube réaction — dont la vitesse d'hémolyse serait celle du tube témoin diminuée du retard dû à la fixation des anticorps syphilitiques en présence d'un antigène P. aussi spécifique que possible et que nous vérifierions exempt de tout pouvoir empêchant sur le Cpl.

Il était nécessaire, pour rendre les résultats de la méthode comparables entre eux dans une même série, de tenir compte de l'hémolyse du témoin de chaque sérum ; nous nous proposions dès lors de caractériser un sérum syphilitique par le rapport (à un temps x à déterminer) de la différence des variations de densité optique du sérum sans antigène P. et du même sérum avec antigène P. sur la variation de densité optique du sérum sans antigène ; rapport que nous multiplierons comme précédemment par 100 pour obtenir une échelle croissante en positivité de 0 à 100.

II. - Deuxième Technique suivie :

Pour chaque Sérum la formule du tube réaction demeure :

E.P. :	1 cc 2
Antigène P. à 1/10	0.9
Sérum malade inactivé.....	0.6
Cpl au 1/5	1 cc 05
S. H. au 1/20	2 cc 25
Globules rouges purs	3 cc

Dans la formule du tube témoin de chaque sérum ; l'antigène est remplacé par 0 cc 9 d'eau physiologique.

Afin que des séries différentes d'examen soient comparables entre elles, il semble nécessaire que le complexe hémolytique ait toujours la même action, nous avons alors joint à chaque série de mesures deux tubes que nous appellerons « *témoins d'hémolyse* » : contenant les mélanges plus haut où le sérum du malade est remplacé par de l'eau physiologique : leur formule est donc :

	TÉMOIN D'HÉMOLYSE avec antigène P.	TÉMOIN D'HÉMOLYSE sans antigène P.
E. P.	1 cc 8	2 cc 7
Antig. 1/10	0 cc 9	0 cc 0
Cpl. au 1/5	1 cc 05	1 cc 05
S. H. au 1/20	2 cc 25	2 cc 25
Gl. rouges	3 cc	3 cc

Nous devons avoir, dans les mêmes conditions de temps et de température, la même hémolyse de ces deux tubes dans les différentes séries d'examen, et par là ces tubes nous permettent de vérifier la valeur de nos réactifs, car lorsqu'ils n'ont pas la même hémolyse, le titre du sérum de lapin anti-mouton étant stable dans les conditions où nous le conservons, nous avons à faire :

1°) Soit à un sérum de cobaye plus faible ou plus fort que les compléments normaux ;

2°) Soit à une eau physiologique non isotonique ;

3°) Soit à des globules de moutons anormaux ; altérés, par exemple ;

4°) Soit à une erreur dans la température, le temps de réaction ou les dilutions des divers réactifs.

La comparaison de ces deux tubes nous donne de plus un moyen de contrôle du pouvoir anticomplémentaire de l'antigène P.

Dans l'examen d'un sérum négatif, quel que soit son pouvoir hémolytique propre, il est évident que l'hémolyse doit suivre, dans le tube de réaction, la même marche que dans le tube témoin, et que la courbe d'hémolyse dans le temps doit, à moins de propriétés du sérum gênant ou favorisant fortement l'hémolyse, se beaucoup rapprocher des courbes d'hémolyse des " témoins d'hémolyse ". Nous donnerons deux séries choisies parmi les

réactions faites avec cette technique. Il nous semble inutile de donner les calculs qui sont très simples, nous les avons exposés plus haut une fois pour toutes, nous nous contenterons des graphiques qui les résument.

PREMIERE SERIE :

Cette série (cf. *tableau IV, II^e partie,* p. 66) comporte les graphiques représentatifs des variations de densité optique des témoins (tubes sans antigène) des sérums examinés sur ce même graphique première partie ; les examens étant faits comparativement avec les mêmes réactifs et au même temps.

Nous notons que la variation de densité optique du témoin d'hémolyse sans antigène à un temps donné est très proche de celle du témoin avec antigène ; au temps 0 la différence de densité optique apportée par l'antigène P. est pratiquement nulle.

La mesure est faite après 1 heure, puis 2 heures de réaction à 15° C ; les sérums sont caractérisés par le rapport que nous avons défini plus haut, les chiffres en sont exprimés sur le tableau IV face aux résultats donnés par la première méthode.

Ainsi, après 2 heures de réaction :

$$\textit{Sérum 1 :}\quad \frac{150 - 155}{150} \times 100 = -3$$

$$\textit{Sérum 5 :}\quad \frac{150 - 140}{150} \times 100 = +6$$

$$\textit{Sérum 6 :}\quad \frac{102 - 14}{102} \times 100 = 86 \quad \ldots\ldots\ldots \text{ etc...}$$

Nous voyons que les résultats de la première méthode sont ici confirmés. On remarque cependant que pour le sérum 6 à pouvoir légèrement anti-hémolytique, la correction apportée par la nouvelle méthode montre ce sérum légèrement moins positif. Cependant le chiffre 86 qui indique une forte positivité nous semble encore trop élevé comparativement au chiffre, par exemple du sérum 12 = 95...

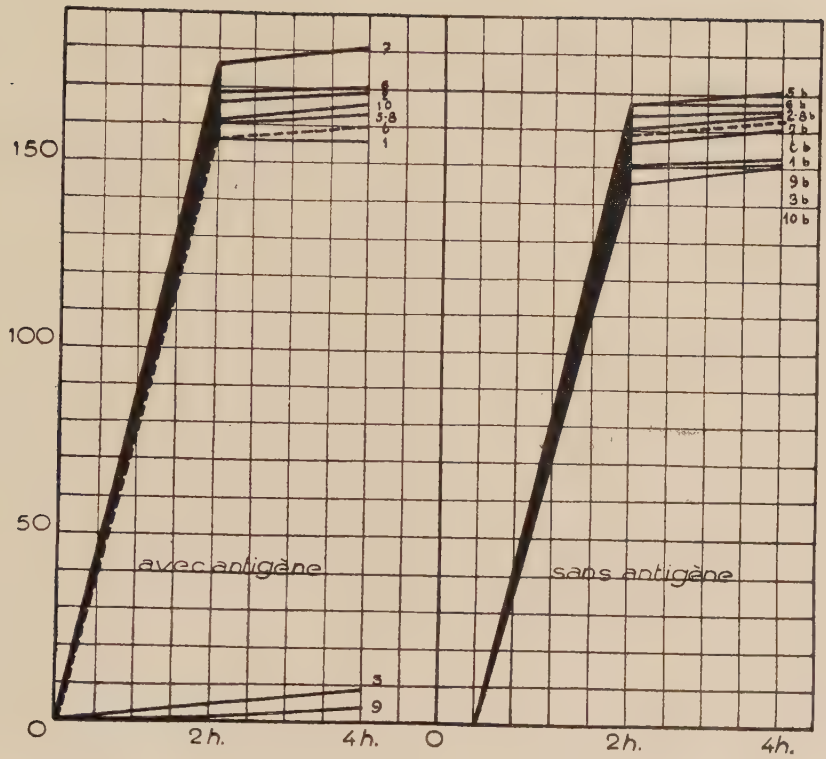


TABLEAU V.

Sérums	Méthodes de Contrôle					Rapport après 2 h. de réaction
	H.	C. M.	K.	J.	V.	
1	— — —	— — —	— — —			0
2	— — —	— — —	— — —			— 1
3	+ + +	+ + +	+ + +			96
5	— — —	— — —	— — —			4
6	— — —	— — —	— — —			0
7	— — —	— — —	— — —			— 9
8	— — —	— — —	— — —			2
9	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	72	99
10	— — —	— — —	— — —			— 9

DEUXIEME SERIE :

Nous la résumons sur le *tableau V*, p. 73. Elle nous situe 8 sérums négatifs entre — 9 et + 4 ; les sérums très positifs 3 et 9 respectivement à + 96 et + 99. L'un et l'autre sont des sérums de syphilis tertiaire en début de traitement.

Le sérum 9 appartient à une femme de 36 ans ayant fait un chancre à 18 ans et s'étant traitée alors durant 1 an ; elle avait abandonné tout traitement depuis 17 ans et était venue quelques jours avant cette prise de sang pour aortite à la consultation. Traitée au Novarsenobenzol. Nous sommes ici à la fin d'une première série de Rhodarsan.

Dans d'autres séries d'examens par cette méthode, 32 sérums négatifs à toutes les méthodes de contrôle s'étagent entre — 10 et + 12 ; un sang ne paraîssant avoir aucune atteinte syphilitique a cependant atteint + 33.

Cinq sérums très positifs se sont étagés entre + 89 et + 100. Un autre a donné + 79 : c'est le sérum d'une femme de 56 ans atteinte de syphilis tertiaire, traitée depuis 5 mois au 914 (Rhodarsan) et Bivatol, la prise de sang date du début d'une série de Bivatol après un repos de 1 mois. Les réactions de contrôle étaient :

Kahn : + + ±

C. M. - J - R - M. K. R. II : + + +

Vernes : 11.

TEMPS OPTIMUM DE LA MESURE DE LA VITESSE D'HEMOLYSE DU COMPLEXE EN REACTION :

Les rapports ci-dessus mentionnés ont tous été établis avec les variations de densités optiques mesurées après deux heures de réaction.

Des essais menés avec toute l'aseptie nécessaire pendant 6 heures nous ont montré que, aussi bien les témoins d'hémolyse que les sérums négatifs semblaient stabilisés après deux heures de réaction. Il est curieux de remarquer, comme le montre déjà pour 4 heures le graphique du *tableau V*, p. 73, que cette stabilisation semble retardée par certains sérums positifs.

Cet optimum de mesure établi, il nous a paru inutile de multiplier les déterminations ; nous nous sommes dès lors contenté d'établir le rapport caractéristique du sérum après 2 heures de réaction.

LAQUAGE DES SERUMS

Le sérum humain normal, limpide à jeun, opalescent après les repas, est normalement jaune. « Cette coloration est susceptible de varier sensiblement au cours de certains états pathologiques » *(61)* : pigments biliaires, laquage, etc...

L'hémolyse du mélange que nous mettons en réaction est au temps 0 sensiblement la même pour tous les sérums normaux et syphilitiques ; de même la différence d'hémolyse au temps 0 entre les témoins d'hémolyse et les tubes contenant du sérum humain ne dépasse pas 5 divisions.

Lorsque le laquage d'un sérum est faible, l'hémolyse primitive étant pour ce sérum la même dans le tube témoin et le tube réaction, le rapport caractérisant le sérum se trouve très peu modifié.

Dans le cas d'un sérum fortement laqué — provenant habituellement d'une prise de sang faite sans les précautions voulues — la différence de densité optique au temps 0 entre les tubes contenant du sérum et les témoins d'hémolyse, peut dépasser 12 divisions, il est alors nécessaire de déterminer la densité optique des mélanges contenant ces sérums au temps 0 afin d'effectuer la correction due au laquage.

*
**

Dans les essais présentés jusqu'ici, nos examens ne nous ont guère amené que des sérums négatifs ou très positifs. Ayant pu nous procurer des sérums de positivité moins élevée nous avons eu, avec la série dont nous reproduisons ici les résultats, la surprise de voir notre méthode en désaccord avec les méthodes de contrôle qui, doublées, nous donnèrent des résultats très voisins.

Sérums	Méthodes de contrôle : *R.*	*K.*	*C.M.*	*J.*	*Vernes*	Méthode après 2 h
1	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	72	environ 100
2	— — —	— — —	— — —			0
3	+ — —	— — —	— — —			0
5	— — —	— — —	— — —			+ 2
6	— — —	— — —	— — —			— 13
7	— — —	— — —	— — —			— 15
8	+ + +	+ ± —	+ + +	+ + +		+ 65
9	+ + +	+ ± —	+ + +	+ + +	1	+ 12
10	+ — —	— — —	+ ± —	+ ± —	0	0

Ci-joint les signes cliniques des 4 sérums positifs.

1 — C'est le sérum 9 du tableau V (signes cliniques, p. 74) conservé huit jours à la glacière à + 2°C.

8 — Sang très difficilement coagulable. Sérum fortement laqué, la correction était nécessaire. Provient d'un vieillard de 67 ans atteint d'une aortite syphilitique. Traité depuis 5 ans au Cy^2Hg.

9 — Homme, 31 ans ; la prise de sang examinée a été faite lors de la dernière injection d'une série de Bivatol de 15 injections. Cet individu blanchi d'une syphilis et négativé un an avant, est revenu réinfecté et positif à toutes les réactions de contrôle. A noter que le traitement a fait tomber le Vernes de 22 à 1 en un mois.

10 — Femme de 32 ans. Syphilis découverte lors d'une grossesse il y a 4 mois. Soignée depuis lors au 914 ; prise de sang faite après repos.

Etant donnés les résultats obtenus, nous avons refait, nous servant du même complément, la réaction pour les sérums 2 - 3 - 9 - 10 pour voir s'il n'y avait pas d'erreur expérimentale.

Nous donnons ici les résultats des mesures avec antigène — les variations de densité optique des tubes témoins étant sensiblement les mêmes que ceux des témoins d'hémolyse — (les sérums en question n'ayant pas de propriétés fortes antihémolytiques), ils montreront la précision que l'on peut attendre de la mesure :

Variations de densité optique après 2 heures de réaction :

Sérums	1re Mesure	2e Mesure
2	158	158
3	151	153
9	140	145
10	169	167
Témoin d'hémolyse avec antigène	150	156

Dans cette série les sérums 9 et 10 donnent des résultats ne cadrant pas avec les réactions de contrôle. Le sérum 9, négatif

à la méthode, est certainement un sérum positif : le Vernes à 1 qui n'accuse qu'un sérum légèrement suspect s'explique du fait de l'extrême sensibilité de cette réaction à l'action du traitement ; c'est la courbe sérologique du malade qui serait ici intéressante ; les autres réactions sont positives.

Le sérum 10 auquel notre méthode ne prête aucune positivité est positif au C.M. et J., plus légèrement au Rubinstein, mais négatif au Kahn.

On voit, par l'exemple de ces deux sérums, les difficultés devant lesquelles nous nous sommes trouvé à ce moment.

En effet, si la méthode essayée cadrait avec les réactions de contrôle, tant pour les sérums exempts de toute atteinte syphilitique que pour les sérums très positifs, elle nécessitait l'établissement d'une échelle et d'un seuil de positivité. Or, ici, la méthode négativait des sérums certainement positifs, tel le sérum 9 ; nous avons pensé que ce manque de sensibilité provenait d'une action hémolytique trop forte.

Nous avions voulu, de même que Vernes avait au début de son travail déterminé les conditions de floculation qui distinguaient le plus nettement un sérum positif d'un sérum normal, mettre le plus d'écart possible entre les sérums syphilitiques et normaux, séparant les uns des autres les sérums positifs..., sans doute le complexe hémolytique choisi à cet effet était-il trop fort et la sensibilité était-elle compromise dans les basses positivités.

Si nous comparons un tube de notre réaction avec le tube le plus sensible du C.M., nous voyons que, pour un volume total de 3 cc. et pour des doses égales de sérum humain et d'antigène, nous employons environ 0,20 cc. de plus de Cpl. au 1/10e, 20 fois plus d'hématies et 10 fois plus de sérum hémolytique ; malgré la différence sensible entre notre réaction et la R. type de W., la force hémolytique de notre complexe semble extrême.

Nous avons repris à nouveau, à partir de ce complexe trop peu sensible, les problèmes étudiés dans la première partie de ce travail.

Il ne fallait pas songer à diminuer la durée de réaction à + 15°C., nous avons montré que la réaction ne se stabilise qu'après un temps assez long.

Nous aurions pu abaisser la température, mais nous savons que la vitesse d'hémolyse diminue très vite lorsque celle-ci dimi-

nue. Il nous restait à diminuer la force hémolytique du mélange en réaction.

4 moyens s'offraient à nous :

1°) Diminuer la teneur en complément ;

2°) — — en sensibilisatrice hémolytique ;

3°) — l'une, augmenter l'autre ;

4°) — la concentration de ces deux constituants.

Nous avons expérimenté, avec des sérums positifs et normaux un grand nombre de complexes, sans modifier les conditions de température et de durée de la réaction (que nous avons augmentée dans la suite), les concentrations en antigène P. et en sérum humain ne variant pas.

Nous citerons quelques complexes parmi ceux étudiés :

	I	II	III	IV	V
Sérum humain	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
E.P.	0,70	1	0,70	1,65	1
Antigène au 1/10e . .	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Cpl. au 1/5e.	0,60	0,30	0,60	0,30	0,30
S.H.	1,25 au 1/20e	1,25 au 1/20e	1,25 au 1/100e	0,60 au 1/100e	1,25 au 1/100e
Globules de mouton.	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70

Ces complexes ont la formule :

I : à peu près de l'ancien complexe (tous les éléments multipliés par environ $\frac{5}{3}$).

II : du I avec $\frac{1}{2}$ dose complément.

III : du I avec $\frac{1}{5}$ dose S. H.

IV : du III avec $\frac{1}{2}$ dose S. H. et $\frac{1}{2}$ dose Cpl.

V : du IV avec double dose S. H.

Dans les complexes IV et V l'hémolyse est trop faible, même après 4 heures de réaction à 15°C (et il semble mal commode d'établir une méthode demandant plus de 4 heures de réaction).

Il nous a semblé que la diminution de la teneur en Cpl. (type complexe II) ajoutant à la sensibilité nuirait à la spécificité de la méthode.

Pour la série d'examen présentée p. 75 et qui nous mena à cette étude de nouveaux complexes : les meilleurs résultats nous

furent donnés par le complexe III ; après 4 heures de réaction à 15°C : il augmentait fortement la positivité du 9 qui passait à 61, ne modifiant pas sensiblement les autres résultats.

Pour le sérum 10 il nous a été impossible, comme pour un autre sérum dans son genre, d'obtenir une positivité quelconque ; nous n'avons pu, faute de sérum, continuer leur examen.

Nous avons expérimenté simultanément les complexes I et III qui ne diffèrent entre eux que par une dose d'hémolysine anti-mouton 5 fois moindre dans le complexe III.

Procédant comme lors de l'étude du complexe I, nous avons cherché le temps optimum de mesure pour le complexe III : l'hémolyse ne semble se stabiliser qu'après environ 3 heures de réaction à 15°C ; nous n'avons donc fait la mesure qu'après 4 heures de réaction à 15°C.

Opérant la mesure sur les mêmes sérums, tant syphilitiques que normaux avec les 2 complexes, la lecture à la cellule se faisant avec le complexe I après 2 heures, avec le complexe III après 4 heures de réaction, nous avons pu voir que les rapports caractérisant les sérums ne différaient guère pour les sérums très positifs et négatifs ; le complexe III se montre beaucoup plus sensible que le I qui négative les sérums légèrement positifs. C'est à partir de cette formule que nous avons établi la méthode que nous formulons dans le prochain chapitre.

Un inconvénient de ce complexe plus faible en hémolysine est que, lorsque le sérum humain examiné a un pouvoir anti-hémolytique important, l'hémolyse n'est pas suffisante dans le tube témoin de ces sérums et la lecture de la réaction est impossible.

Nous n'avons pu déterminer des conditions de réaction telles qu'elles donnent une hémolyse suffisante du témoin d'un sérum anti-hémolytique, en même temps qu'elles conservent assez de sensibilité à la méthode pour donner un retard à l'hémolyse assez important dans le tube réaction d'un sérum faiblement positif.

Dès lors, pour les sérums anti-hémolytiques, qui d'ailleurs sont rares, repoussant l'addition en cours de réaction de complément ou d'hémolysine qui ne nous a pas donné de bons résultats, l'élévation de la température qui donne des résultats

inégaux..., nous opérons avec les deux systèmes hémolytiques précités ; lorsque le système faible en hémolysine ne réussit pas à vaincre dans le tube témoin le pouvoir empêchant..., le système fort y a toujours réussi..., évidemment c'est là un procédé d'attente qui demande à être employé avec beaucoup de précaution.

VII. — MONTAGE DE LA METHODE

Dans ce chapitre, nous exposerons les détails opératoires de la méthode que nous avons pratiquée et dont nous donnons quelques résultats au chapitre suivant.

Le sang du malade est prélevé aseptiquement en tube stérile, loin de la période digestive ; un refroidissement brusque nuisant à la rétraction du caillot et à la séparation du sérum, nous laissons le caillot se former à la température du laboratoire. Quand il est devenu ferme, on le décolle du tube avec un fil de platine stérile. On porte les tubes à la glacière.

Le lendemain les sérums sont séparés des caillots à la pipette stérile (nous n'userons de la centrifugation que lorsque le sang se coagulera mal, ou que nous aurons peu de sérum à notre disposition) et mis en tubes stériles.

Le sérum de cobaye est recueilli : nous opérons par ponction du cœur et selon les conditions définies p. 116.

Les seringues stériles pleines de sang sont vidées dans des tubes à centrifuger stériles. On laisse coaguler à la température du laboratoire ou on défibrine par agitation, et on centrifuge aussitôt.

Les sérums de cobayes réunis dans un même tube stérile sont portés à la glacière à + 2° jusqu'au moment de la réaction, le lendemain.

Le sang de mouton prélevé aseptiquement la veille à l'abattage en vase stérile, et défibriné par agitation sur des billes de verre, est privé de son plasma par autant de lavages au sérum physiologique qu'il est nécessaire afin qu'après le dernier lavage le liquide surnageant le culot de centrifugation soit très clair. Les globules ramenés au volume du sang employé sont conservés à + 2°C.

Le lendemain, les réactions de R. et Meinicke sont mises en route ; puis les sérums sont chauffés 30 minutes à 56°.

On pratique le K. et les titrages du C.M. sont mis à l'étuve ; lorsque les sérums sont refroidis et les titrages terminés, le C.M. et le J. sont mis en route.

Ainsi pratiqué, l'ensemble de ces réactions pour 10 à 15 examens ne dépasse pas 3 - 4 heures, tous les réactifs étant prêts de la veille. Nous passons alors à la méthode ci-dessous exposée :

L'antigène de Bordet-Ruelens est mis à évaporer à l'étuve à 37° environ une heure avant son emploi : sur de larges soucoupes en verre Pyrex, nous déposons 1 cc. de sa solution alcoolique, nous évaporons à l'étuve à 37° ; le contenu de chaque soucoupe est repris par 1 cc. d'eau distillée stérile, puis 2 fois par 1 cc. d'eau physiologique stérile ; on complète à 10 cc. à l'eau physiologique et on emploie aussitôt.

Le sérum hémolytique est dilué selon le titrage exposé p. 130 (titrage qui nous permet d'obtenir une hémolyse aussi exacte que possible dans les témoins d'hémolyse de séries d'examens différentes), à l'eau physiologique stérile.

Le complément est dilué de la même manière au 1/5e au moment de l'emploi.

Tous les constituants de la réaction sont portés à 15°C par un bain maintenu à cette température.

Les réactifs sont répartis rapidement dans les tubes de réaction : tubes à hémolyse en Pyrex de 1 centimètre de diamètre sur 5 centimètres de haut, stériles et nettoyés uniquement à l'eau distillée.

Pour chaque sérum nous mettons 2 tubes en réaction :

Un tube proprement dit de réaction :		Un tube témoin du sérum :
Eau physiologique.	0.40	. . . . . 0.70
Antigène au 1/10e.	0.30	 0
Sérum Humain.	0.20	. . . . . 0.20
Cpl. au 1/5e.	0.35	. . . . . 0.35
S.H. dilué selon le titrage. . . .	0.75	. . . . . 0.75
Globules purs de mouton. . . .	1	 1

Nous ajoutons deux tubes à l'ensemble de la série ; tubes ayant les formules des tubes ci-dessus, mais où le sérum humain

est remplacé par de l'eau physiologique. Ces tubes témoins d'hémolyse nous permettent de vérifier, comme nous l'avons exprimé p. 71, tous les constituants du système.

Les tubes sont agités à chaque addition de réactifs et introduits dans le thermostat à 15°C avant l'addition des globules.

On répartit alors rapidement les globules et l'on agite à nouveau.

On ferme le thermostat, et on vérifie que la température se maintient à 15°C à l'aide d'un thermomètre lisible de l'extérieur. On agite les tubes de temps en temps en prenant garde de ne pas changer la température de l'ensemble.

Au bout de 4 heures de réaction, les tubes sont retirés les uns après les autres, agités, et mis directement dans les supports du centrifugeur à la glacière, puis centrifugés après quelques minutes. Aussitôt après centrifugation, on fait la mesure ; par décantation on remplit la cuve du néphélocolorimètre avec le liquide plus ou moins hémolysé surnageant les globules et on fait la mesure de la densité optique. La cuve est rincée soigneusement à l'eau distillée, après chaque mesure.

On fera, avant chaque série de mesures, 2 témoins d'hémolyse au temps 0 :

L'un avec antigène :		*L'autre sans antigène :*	
Eau physiologique.	0.60	. . . . .	0.90
Antigène à 1/10e.	0.30	. . . . .	0
Cpl. au 1/5e.	0.35	. . . . .	0.35
S.H. (dilution voulue)	0.75	. . . . .	0.75
Globules.	1	. . . . .	1

ils permettent de voir s'il n'y a aucune hémolyse des globules qu'il faudrait alors achever de laver, ou, si nous avions un sérum hémolytique ou un complément laqué, de mesurer la densité optique au temps 0 afin de tenir compte dans nos mesures, des variations à la densité optique apportées par cette hémolyse au départ.

Dans tous les autres cas c'est là une bonne précaution, car, la densité optique de ces mélanges ne variant guère avec un appareil donné, nous avons ainsi, pour chaque mesure un moyen de contrôle de la bonne marche de l'appareil : la cellule peut être impressionnée par exemple par la réflexion d'une source lumineuse sur un mur blanc, sur un objet métallique, perturbation qui

pourrait amener des erreurs dans les mesures, de même on peut se tromper dans le choix de l'écran, etc...

Comme nous l'avons déjà dit, lorsqu'un sérum est fortement laqué, il vaut mieux faire la correction d'hémolyse en faisant avec ce sérum un témoin au temps 0 ; la variation de densité optique d'un des tubes de réaction de ce sérum, après 4 heures de réaction devient :

(densité optique au temps 0) - (densité optique après 4 h. de réaction).

Comme nous l'avons dit au chapitre précédent : pour les sérums n'ayant donné aucune hémolyse des témoins au Rubinstein, on mettra en route aussi une série de réactions où la dilution de sérum hémolytique employée sera remplacée par une dilution 5 fois plus concentrée en hémolysine, et on fera la mesure de la variation de densité optique après 2 heures de réaction.

VIII. — RESULTATS DE LA METHODE

Pratiquant la réaction dans les conditions exposées dans le précédent chapitre, nous avons obtenu les résultats suivants :

I. - Sérums négatifs à toutes les méthodes de contrôle :

Plus de 200 sérums négatifs à toutes les méthodes ou donnant au sérum frais une positivité si légère qu'il n'est pas possible d'y attribuer un sens clinique, ont été examinés.

48 % se sont situés entre un chiffre négatif et + 5.

34 % entre + 5 et + 15.

14 % entre + 15 et + 25.

4 % ont dépassé ce chiffre, donnant :
27-29-31-33-33-35-38-39-42.

Malheureusement, avec les sérums examinés, étant donnés les antécédents sexuels des femmes dont ils provenaient pour la plupart, nous n'avions que très rarement la certitude d'une absence totale de tares syphilitiques ; cependant ces résultats sont troublants ; 5 de ces sérums (ceux donnant 27-31-33-33-38) n'accusant absolument aucune positivité aux méthodes classiques. Nous donnerons les signes cliniques types du sérum donnant 38.

Sérum 1. — Homme 30 ans - chancre il y a 4 ans - traité depuis 2 ans au 914 (Rhodarsan) et au Bivatol. Le sérum est examiné à la 3e injection d'une série de Bivatol. Ce malade était négativé depuis plus d'un an à toutes les réactions de contrôle... Nous n'avons pu nous procurer son Vernes..., notre chiffre est donc inexplicable.

Nous ne multiplierons pas les signes cliniques des malades négatifs et n'en citerons que 3 cas :

Sérum 2. — Femme adulte - Syphilis secondaire traitée au 914 (Rhodarsan).

Prise de sang le jour d'une injection de 0 gr. 60 de Rhodarsan. Négative à toutes les méthodes de contrôle. Réaction donne = — 3.

Sérum 3. — Homme, 33 ans - Chancre il y a 10 ans. Interrompt 2 ans son traitement, le reprend il y a 4 ans (Bi et As). Négatif aux méthodes de contrôle ; à la fin d'une série de Bivatol accuse + 8 à la méthode.

Sérum 4. — Homme, 48 ans - chancre il y a 18 ans - Roséole — Sp. de Gibert, K.I., puis 914 durant 4 ans le négativent. Il y a 5 mois, B.W. positif. Traité depuis lors au Cyanure, puis Sulfarsenol ; l'examen accuse — — — aux méthodes d'hémolyse ; + — — au Kahn. Ce sérum, très chargé en pigments biliaires avait un pouvoir antihémolytique élevé, obligeant à employer le complexe fort qui donne : — 8.

Quelques sérums accusent un chiffre négatif très fort..., nous avons ainsi obtenu : — 30, — 33..., ces résultats semblent inexplicables à moins d'erreurs opératoires : le tube sans antigène ne devant, en aucune manière, donner une hémolyse plus faible que celui avec antigène.

II. - Sérums syphilitiques :

Nous avons pu traiter par notre méthode 71 sérums de positivité variable.

28 s'avéraient très positifs (+ + +) à toutes les méthodes. A notre méthode, 17 se sont étagés entre 56 et 95 — 11 entre 95 et 100 : c'est-à-dire que, étant données les erreurs opératoires, ces sérums donnaient la positivité maxima où la méthode ne peut plus séparer 2 sérums positifs.

Les autres donnaient des résultats panachés aux réactions de contrôle ; ils se situaient entre 0 et 78.

Nous donnons ici quelques-uns des 17 résultats de la méthode qui semblent cadrer le moins avec les méthodes classiques de contrôle, soit qu'ils apparaissent comme trop positifs :

	R.	*C.M.*	*K.*	
Sérums :	+ ± —	+ — —	± — —	——> 49
	+ — —	+ — —	— — —	——> 56

soit qu'ils donnent un chiffre négatif ou trop faiblement positif :

	R.	*J.*	*C.M.*	*K.*	*V.*	
ÉRUM 16 (*cf. p. 90*)	+ ± —	+ ± —	— — —	— — —	4	——> 20
e même les sérums:	+ ± —		— — —	± — —		——> 0
	+ — —		+ — —	+ — —		——> 0
	manque Cpl.		+ + ±	+ — —		——> 24
	+ + —		+ ± —	+ — —		——> 15

Pour certains sérums les résultats ont été doublés ; pour d'autres, étant données les grosses quantités de sérum nécessaires pour les méthodes de contrôle, cela n'a pas été possible. Peut-être faut-il voir dans ces défaillances de la méthode une erreur opératoire (qui porterait sans doute sur la température de réaction, point essentiel de la méthode), mais peut-être aussi une action d'albumines les unes sur les autres, ou une action inexplicable de certains sérums à la méthode... C'est en tous cas une preuve évidente que la méthode proposée n'est pas encore définitivement au point.

Nous présentons ici quelques résultats plus intéressants avec les signes cliniques que nous nous sommes procurés dans les services du Dr Yves Bureau.

A - Syphilis acquise :

1°) *SYPHILIS PRIMAIRE :*

Sérum 5. — Homme, 33 ans - Entré la veille avec chancre du sillon balano-préputial sous le frein et remontant à 4 jours. Volumineuse adénopathie inguinale.
Ultra microscopie : + + + +.
Méthodes de contrôle : — — —.
Méthode : ———> 0.

Sérum 6. — Homme adulte, à sa première visite, n'a eu aucun traitement. Présence du chancre.

Réactions de contrôle : + + +.

Vernes : 71.

Méthode ———> 92.

2°) *SYPHILIS SECONDAIRE :*

a) Non traitée : néant.

b) traitée :

Sérum 7. — Homme de 22 ans. Il y a 2 ans, plaques muqueuses sur le gland et les amygdales. Cet homme conjoint du n° 8, se soigne comme cette femme très irrégulièrement (914, Cy^2Hg.).

Notre examen, à la fin d'une série de Rhodarsan, montre toutes les réactions de contrôle : + + +, la méthode accuse : 58.

Sérum 8. — Conjointe du 7 — 30 ans — montre il y a 2 ans des plaques muqueuses de la vulve, mise au 914 (Rhodarsan), elle interrompt le traitement 1 an. Remise au Rhodarsan, on note en Mars 1936 des syphilides des deux avant-bras. Un examen pratiqué en Juin, au début d'une nouvelle série de Rhodarsan, accuse : + + + aux réactions classiques —— 1 au Vernes —— 56 à la méthode.

Cette femme abandonne pendant deux mois son traitement ; une prise de sang montre alors les réactions de contrôle + + +. La méthode donne 95.

Sérum 9. — Femme de 20 ans — venue à la consultation pour furonculose (?) du cou avec adénite ; présente une plaque syphilitique dans la région cervicale, ganglions durs, mobiles. Après 2 mois de traitement mixte : Rhodarsan-Bivatol, le Vernes est descendu de 75 à 7 ; les réactions de contrôle de + + + sont devenues : Kahn — — —

C. M. — J — R : + + ±

La méthode accuse alors 76.

3°) *SYPHILIS TERTIAIRE :*

a) Non traitée :

Néant.

b) Traitée :

Sérum 10. — C'est un sérum déjà examiné dans le tableau V, p. 73 (N° 9). — 47 jours plus tard après un repos de 5 semaines et à la deuxième injection d'un traitement mixte : Bivatol-Rhodarsan, le sérum est toujours : + + + à toutes les réactions ; nous n'avons pas pu avoir le Vernes qui, 40 jours

avant cet examen, était à 56, et 45 jours après à 71. Le sérum très fortement antihémolytique nous oblige à employer pour la méthode, le complexe fort qui donne : 90.

Sérum 11. — Homme 58 ans, a contracté la syphilis 22 ans avant de se faire soigner. Traité à l'Amphomuth Ronchèse (Bi-métal colloïdal) ; un examen pratiqué après une première série et un repos accuse :

R — K — C. M. — J : + + +
Vernes : 57.
Méthode : 92.

Sérum 12. — Vieillard, syphilis très ancienne. Depuis 3 ans continuellement traité au Bivatol :

R — C. M. — J : + + +
K : + + ±
Vernes : 6.
Méthode : 78.

Sérum 13. — Homme 64 ans. Syphilis contractée il y a 15 ans. Entré il y a 5 ans pour gomme syphilitique du larynx, et soigné depuis au Bivatol. Examen en fin de série de Bivatol :

K : + + +
C. M. et J : + + ±
R. : + — —
Vernes : 8.
Méthode : ——> 74.

Sérum 14. — Femme 55 ans. Syphilis nerveuse traitée depuis 3 ans. Ne supporte ni As — ni Bi — est mise au Cy^2 Hg. L'examen suivant fait à la fin de la huitième série de Cyanure montre :

Réactions de contrôle : + + + et Vernes à 2.
Méthode ——> 56.

Sérum 15. — Homme 51 ans. Syphilis primaire il y a 24 ans — se soigne alors durant 2 ans. Reste 13 ans sans se soigner. Reprenant le traitement il y a 9 ans, ne supporte ni les sels d'arsenic ni ceux de bismuth. Traité longuement au mercure, on le remet au Rhodarsan qu'il tolère. Il reste 7 ans + + +. Ici nous sommes à la première injection d'une série de Rhodarsan faite après 3 mois de repos.

R. — C. M. — J — : + + +
K. : + ± —
Vernes : 6.
Méthode ———> 49.

Sérum 16. — Homme de 40 ans. Chancre il y a 16 ans. Interrompt le traitement pour le reprendre il y a un an. Cet examen est fait lors de la reprise du Rhodarsan après un repos de un mois et demi :
C. M. : — — —
J. : + ± —
R. : + ± —
K. : — — —
Vernes : 4.
Méthode ———> 20.

Sérum 17. — Homme de 52 ans. Lésions ulcérées de la lèvre supérieure et de l'angle interne gauche du nez. Plaie de la jambe gauche. N'a pas de cicatrice de chancre sur la verge ; reflexes tendineux et cutanés normaux, la pupille ne réagit pas à la lumière. A son entrée il y a 2 mois : + + + aux réactions de contrôle, son Vernes = 120. Après 1 mois 1/2 de traitement au Bivatol, les réactions demeurent + + + et le Vernes monte à 224. A noter le pouvoir très fortement anti-hémolytique du sérum. Emploi du complexe fort.
Méthode ———> 100.

Sérum 18. — Femme de 44 ans. Mari syphilitique. Soignée depuis 17 mois au Bivatol.
R — C.M. — J : + + +
K : + ± —
Vernes : 7.
Méthode : 70.

Sérum 19. — Homme 45 ans. Choroïdite spécifique de l'œil droit. Chancre il y a plus de 20 ans. Traité au Cyanure Hg. Un premier examen fait à la fin d'une série de Cy^2Hg donne :
Réactions classiques : + + +
Méthode : 60.

Un mois après cet examen, le malade dont le sérum est anormalement opalescent, accuse :
R : + + —

K. : + — —
C. M. : + + ±
J. : + + +
Vernes : 6.
Méthode : ———> 54.

Cette prise de sang était faite au cours d'une série de cyanure car le malade était atteint de troubles paresthésiques des membres supérieurs.

Sérum 20. — Homme 40 ans. Entré il y a 4 ans pour iritis syphilitique. Traité aux Bi-As-Hg successivement. Prise de sang après un arrêt de 4 mois dans le traitement.
R — C. M. — J. + + +
Kahn : + + —
Vernes : 12.
Méthode : ———> 100.

Sérum 21. — Femme 35 ans. Traitée depuis 7 ans pour syphilis tertiaire. Après un repos de 3 mois sur une série de Bivatol :
R : + + —
C. M. : + ± —
K. : — — —
Méthode : 55.

Sérum 22. — Homme 39 ans. Syphilis tertiaire de la lèvre supérieure.
R. : + — —
K. : — — —
C. M. : + ± —
J. : + + —
Vernes : 0.
Méthode : 46.

Sérum 23.— Homme 46 ans. Syphilis primaire pendant la guerre. Se fait soigner depuis 3 ans. Ici en fin de série de Cy^2 Hg.
Toutes méthodes de contrôle : + + +
Vernes : 3.
Méthode : 98.

Sérum 24. — Homme 43 ans, mari d'une tabétique, malade cyanosé, tachycardique, arythmique. Reflexes normaux. Depuis 6 mois traité au Cyanure puis à l'acétylarsan..
R. : + ± —

K : — — —
C. M. : + ± —
J. : + + ±
Vernes : 6.
Méthode : ———> 45.

Sérum 25. — Femme de 62 ans. Entrée il y a 4 ans avec une énorme plaie de la jambe droite et lésions osseuses importantes. Ne supportant pas les arsénicaux, est mise au Bismuth. Sérum très opalescent. Accuse + + + aux réactions de contrôle.
Vernes : 123.
Méthode : 100.

Sérum 26. — Homme de 41 ans. Reflexes rotuliens abolis. Grosse amyotrophie des cuisses. Double pied bot congénital. Traité depuis 2 mois au Rhodarsan. Nous sommes à cet examen en fin de série.
Réaction de contrôle : + + +
Vernes : 90.
Méthode : 100.

Le sérum est très fortement laqué, la correction était nécessaire. Le R. était impossible par « manque de complément » et la méthode est faite à l'aide du complexe fort.

Sérum 27. — Femme 41 ans. Plaie syphilitique tertiaire siégeant à la nuque. Réflexes paressseux. Traitée depuis 8 mois au Bivatol. Nous sommes ici en fin de série.
R. : + + +
K. : + + —
C. M. : + ± —
J. : + + +
Vernes : 2.
Méthode : 82.

Sérum 28. — Femme de 52 ans. Syphilis tertiaire. Traitée depuis 4 ans aux arsénicaux et sels de Bi. Au milieu d'une série de Bivatol nous avons :
R. : + + —
K. : + + ±
C. M. : + + ±
J. : + + +
Méthode : 70

Sérum 29. — Homme de 42 ans, vivant depuis 6 ans avec une amie syphilitique. Traité au Rhodarsan depuis 3 mois.

Nous sommes ici en fin de série :

R. - C. M. - J. : + + +
K. : + ± —
Vernes : 6
Méthode : 79

Sérum 30. — Homme de 48 ans atteint de syphilis ancienne ; se fait traiter au Rhodarsan-Bivatol depuis 7 mois.
Réactions de contrôle : + + +
Vernes : 67
Méthode : 100

B - Syphilis héréditaire :

Nous n'avons pu examiner que les sérums suivants appartenant à deux sœurs dont la mère mourut alcoolique et tuberculeuse:

Sérum 31. — L'aînée : 9 ans — front en carène — corysa chronique. Ulcération des commissures des lèvres. Pluri multi ganglionnaire. Retard de développement. Rien d'anormal au point de vue du squelette.

K : — — —
R : + + +
C. M. : + + ±
Méthode : 54

Sérum 32. — La plus jeune : 7 ans 10 mois. Front en carène. Mauvaise dentition. Dents crênelées. Pluri multi ganglionnaire. Etat général moyen. Rien d'anormal au point de vue du squelette.

K. : + — —
R. : — — —
C. M. : — — —
Méthode : + 3

On remarquera la légère positivité du Kahn avec réactions d'hémolyse négatives pour le sérum 32. Kahn négatif et réactions d'hémolyse très positives pour le sérum 31. Devant ces résultats et les signes cliniques probables d'hérédo-syphilis, le traitement est établi chez les deux enfants.

III. - Conclusion

Il ne nous appartient pas de tirer conclusion des résultats de la méthode ci-dessus exposés ; nous n'avons pas voulu faire un travail clinique et n'en avions pas les moyens.

Nous avons seulement comparé la méthode que nous avons étudiée, avec un groupe de méthodes classiques ayant fait leurs preuves, et signalé les cas où cette nouvelle réaction donnait des résultats s'écartant de ceux donnés par les autres méthodes.

Nous remarquons que, lorsqu'il y a dans les résultats classiques des réactions dissociées entre réactions d'hémolyse et de floculation, la nouvelle méthode donne généralement des résultats comparables aux réactions d'hémolyse.

Nous remarquons aussi quelques cas où le Vernes n'accuse qu'un sérum négatif ou légèrement suspect, alors que les autres réactions et celle étudiée s'avèrent positives. Ainsi les sérums 8 et 14 étudiés plus haut...

Le Vernes momentanément à 0-1-2 avec sérum syphilitique n'est d'ailleurs pas rare et beaucoup d'auteurs ont signalé, comme Rubinstein « qu'il existe des sérums sûrement syphilitiques qui donnent la densité optique 0 » *(80)* qui devrait rester l'apanage exclusif des sérums normaux ; il est vrai que, d'après Vernes, un chiffre isolé ne caractérise pas un sérum, et le critérium de négativité de Vernes, que nous rappelons, est très sévère et on ne peut conclure à la vraie négativité que « quand à partir d'une dernière injection que cet auteur appelle le jalon arsenical, les 8 prises de sang mensuelles consécutives donnent le tracé horizontal de 8 zéros consécutifs dans l'encadrement de 2 ponctions lombaires normales » *(89)*.

Cependant il est étrange de voir des sérums certainement positifs donner des Vernes momentanément négatifs.

IX. — ETUDE CRITIQUE DE LA METHODE

I. - Exactitude de la méthode :

Il est évident que, pour avoir des résultats vraiment justes et comparables entre eux avec une méthode telle que celle que nous étudions, il faudrait que tous les témoins des sérums en réaction donnent la même hémolyse de façon à n'avoir, dans le rapport qui caractérise chaque sérum, qu'une variable fonction uniquement de la charge en anticorps syphilitique du sérum examiné.

En réalité nous avons deux causes d'inexactitude à la base même de la méthode :

1° La présence de puissances retardant ou activant l'hémolyse et variables avec chaque sérum.

2° Un complément dont la force varie avec chaque série de mesure.

Nous exposons ici dans quelles proportions nous pouvons corriger ces causes d'inexactitude :

1° Pour avoir une réaction vraiment exacte il n'y aurait, comme nous l'avons déjà dit, qu'un seul moyen : doser le pouvoir complémentaire (positif ou négatif) de chaque sérum frais ainsi que de son pouvoir antihémolytique ou hémolytique anti-mouton et amener tous les sérums à contenir le même nombre d'unités de complément et de sensibilisatrice... le rapport de la méthode serait alors strictement comparable avec tous les sérums car fonction du pouvoir anticorps syphilitique du sérum, à supposer toutefois que toutes les substances entravant l'hémolyse soient toujours antihémolytiques ou anticomplémentaires, ce qui n'est pas prouvé.

Nous avons éliminé, en employant le sérum chauffé, la perturbation amenée par le complément ; en employant un système hémolytique anti-globules humains, il serait possible d'éliminer la perturbation amenée par l'hémolyse naturelle anti-mouton...

Dans ce travail nous avons dû limiter notre étude au sérum chauffé avec système anti-mouton, et les puissances hémolytiques anti-mouton variables avec les sérums ne permettent pas d'obtenir un dénominateur constant du rapport caractérisant le sérum ; cependant la variation, pour les 9/10e des sérums, est si infime, que nous pouvons comparer entre eux les résultats obtenus avec une approximation qui ne dépasse pas l'erreur opératoire.

Une cause d'erreur apparaît lorsque le liquide possède un pouvoir fortement anti-hémolytique... dans ce cas nous avons montré la nécessité d'ajouter, à la série ordinaire de réactions, une série où le système hémolytique introduit est très fortement accru...

Si, avec les sérums négatifs et très positifs, cette mesure n'apporte aucune complication, il n'en est pas de même avec les sérums légèrement positifs et si fortement antihémolytiques que le complexe faible ne peut nous renseigner... les causes d'erreurs sont dues à la moindre sensibilité du complexe fort.

Il faudrait, dans de tels cas, employer de nombreux complexes hémolytiques et choisir celui qui donne l'hémolyse désirée du tube témoin... ce cas est d'ailleurs très rare.

2° L'idéal, pour cette réaction, eut été d'avoir un complément stable, amenant toujours, avec le même complexe, la même hémolyse, dans les mêmes conditions de température et de temps. Nous n'avons pu le réaliser mais nous exposons à l'étude du complément (p. 118) comment, en agissant dans des conditions de prélèvement et de conservation déterminées, on peut obtenir un complément à peu près constant.

Ce complément nous a donné des variations dans un rapport tel qu'elles ne dépassent guère les variations apportées par les erreurs expérimentales obtenues en faisant des mesures sur les mêmes sérums avec un même complément à quelques heures d'intervalle : erreurs provenant des inexactitudes de dilution, de température, peut-être des conditions de répartition des divers réactifs.

II. - Seuil de positivité de la méthode :

C'est là le point crucial de l'établissement d'une méthode de mesure, quelle qu'elle soit ; rendu d'autant plus difficile dans le cas présent qu'il semble aujourd'hui établi, axiome que beaucoup posent comme base des études sérologiques, que « la spécificité

est d'ordre quantitatif, et non qualificatif » et que l'épreuve de B. W. n'est pas spécifique quoique fournissant une grande probabilité de coïncidence entre état syphilitique et réaction décelant une rupture de l'équilibre colloïdal d'un sérum x.

Hufschmitt *(39)*, après avoir montré que les antigènes peuvent, en présence de certains sérums humains, fixer une quantité de complément supérieure à celle qu'ils peuvent absorber en l'absence de ces derniers, pense que « la réaction ne peut être spécifique qu'à partir d'une certaine limite ». Ceci s'explique par le double fait que les extraits d'organes aux propriétés antigéniques desquelles on fait appel ordinairement pour les diagnostics de syphilis contiennent des mélanges de lipoïdes, et que divers anticorps existent dans les sérums humains à côté de ceux provenant de l'action du tréponème : dès lors il faut prévoir que certains de ces anticorps (ayant des affinités variables avec les différents sérums) pourront réagir sur certains des lipoïdes contenus dans l'antigène (qui constituent peut-être de véritables « antigènes partiels ») déterminant des réactions aspécifiques plus ou moins prononcées.

Ces réactions aspécifiques, toujours légères, amèneront cependant à la méthode étudiée un chiffre supérieur à 0 pour des sérums qui peuvent être exempts de toute atteinte syphilitique, alors que des sérums faiblement positifs, n'ayant aucun pouvoir anticorps étranger, pourront donner un chiffre peut-être inférieur à celui donné par ces sérums négatifs.

C'est l'établissement de cette frontière entre les sérums syphilitiques et normaux qui a beaucoup préoccupé Vernes, sa réaction n'étant que l'exagération d'une floculabilité normale de base variable avec les sérums... Nous rappellerons l'immense travail fait depuis 25 ans à l'Institut Prophylactique par le Docteur Vernes et ses élèves, comptant plus de 200.000 graphiques de malades *(89)*, étude qui les a amenés à modifier plusieurs fois le seuil de leur réaction... que parfois certains mettent encore en doute, et que Vernes a étayé — tant les notations basses prêtent à discution — de la nécessité de ne caractériser de tels sérums que par des examens répétés et l'établissement d'une courbe sérologique.

Il serait dès lors ridicule, vu le nombre infime de sérums examinés à notre méthode, alors que pour la plupart d'entre eux nous n'avons pu nous procurer les signes cliniques auxquels la R. de W.

ne peut en aucun cas se substituer pour porter un diagnostic de syphilis, ou de non syphilis, de vouloir fixer pour une réaction qui n'en est encore qu'au stade d'étude, un seuil de positivité.

De plus, la réaction proposée dérivant de la réaction de W., il ne faut pas penser que son chiffre puisse être fonction directe de l'infection syphilitique, c'est-à-dire de l'action du tréponème et des toxines syphilitiques sur l'organisme du malade.

Son seul domaine ne pourra être qu'essayer de traduire les modifications provoquées dans le milieu sanguin par leur atteinte..

Nous rappellerons donc les cas où le sérodiagnostic est notoirement insuffisant :

Les réactions aspécifiques que l'on ne peut nier dans le paludisme, la lèpre, les spirochétoses et trypanosomiases : qui peuvent s'expliquer par la présence d'anticorps étrangers réagissant sur des antigènes non spécifiques...

Les défaillances de la méthode, dans les cas exceptionnels de " carences sérologiques " signalées même au cours de certaines syphilis secondaires (Y. Bureau *(13)*), où il faudrait admettre une non-apparition dans le sérum du malade de l'état physico-chimique que représente la réaction de B. W.

La persistance d'une sérologie positive chez des malades ayant eu une syphilis et un traitement, et dont une réinfection syphilitique vient prouver la guérison (Piccardi et Brunetti *(72)*), cas où il faudrait voir une survivance anormale après la guérison de l'état physico-chimique apparu lors de l'infection syphilitique.

Autant de cas dont nous n'aurons sans doute l'explication qu'avec celle du mécanisme de la réaction de Wassermann et de l'action encore mystérieuse du tréponème, explication qui se trouvera sans doute très avancée par l'isolement de la substance spécifique des humeurs syphilitiques qu'annonce A. Vernes qui, « traitant par des solvants appropriés le précipité qui résulte de l'action du péréthynol sur le sérum syphilitique, vient d'extraire la substance qui, introduite dans du sérum non syphilitique, le modifie de telle sorte qu'elle le fait agir comme un sérum syphilitique dans sa réaction photométrique » *(88)*.

Pendant que cet auteur poursuit l'identification de cette substance qu'il a nommé " pallidine ", il faut signaler un travail de

M. Doladilhe qui, ayant déjà montré en 1934 que « le pouvoir disperseur ou antifloculant du sérum total est exercé par sa fraction non dialysable » *(26)*, vient d'établir (Décembre 1936) que cette fraction non dialysable est « constituée par l'association de deux groupes protéiques dont l'un, thermostable, possède la propriété physique de dispersion, et l'autre, thermolabile, dénué de tout pouvoir disperseur ou antifloculant, possède à l'état frais la propriété de sensibiliser un complexe colloïdal à l'action dispersante d'un sérum total ou du groupe de ses albumines »... *(27)* autant de travaux qui laissent à penser que la nature de la substance syphilitique sera éclairée dans un avenir peut-être proche.

III. - Sensibilité de la méthode :

Nous avons essayé d'augmenter la sensibilité de la méthode par les nombreux moyens classiques.

Une méthode facile consiste à diminuer l'hémolyse dans les tubes témoins et de réaction, de façon à faire apparaître, avec un maximum de netteté, une différence même très faible entre l'un et l'autre... notre réaction offre de très nombreux moyens d'atteindre ce but : diminution de la dose de complément ou de sensibilisatrice, de la durée du contact à 15° C, abaissement de la température de réaction... et nous avons exprimé l'idée que sans doute le complexe choisi n'est pas le meilleur...

Mais, cherchant à exagérer la sensibilité de la réaction par les méthodes indiquées, le terme est vite atteint où l'on obtient des réactions positives, même avec des sérums de sujets indemnes de syphilis qui, avec le complexe choisi, donnent des résultats négatifs...

Il en est de même de l'emploi de doses plus élevées d'antigène P., très délicat du fait que, si pour de faibles richesses en sensibilisatrice la quantité de complément fixée croît d'abord avec la concentration en antigène ; au-delà d'une certaine concentration, elle diminue, à mesure que l'antigène augmente, (Lasseur et Spillmann *(47)*... De même l'augmentation de la dose de sérum humain inactivé mise en réaction amène très rapidement des erreurs : en effet d'une part, les propriétés antigéniques de l'extrait n'étant pas spécifiques de la syphilis, d'autre part les sérums possédant des propriétés anticorps surajoutés... plus la quantité d'antigène P. et de sérum humain est grande, plus on a de crainte d'obtenir des résultats non spécifiques. L'augmentation de la dose

de sérum humain introduit aussi dans la réaction de grandes quantités d'albumines étrangères qui peuvent nuire à la réaction, et le pouvoir anticomplémentaire croît parfois très rapidement avec l'augmentation du sérum...

Nous avons alors pensé augmenter la sensibilité de la méthode par l'emploi d'un antigène P. plus sensible que celui de Bordet Ruelens, ou en faisant la réaction dans un milieu se rapprochant davantage, au point de vue constitutif, du sérum sanguin.

1. — *ESSAI D'AUGMENTATION de la SENSIBILITE de la METHODE par l'EMPLOI de l'ANTIGENE de DESMOULIERE :*

Employant une grosse quantité d'antigène P. dans notre réaction, nous n'avons pas voulu l'augmenter encore, et avons pensé ajouter à la sensibilité par l'emploi d'un antigène plus sensible. On sait la très grande sensibilité de l'extrait alcoolique de foie humain cholestériné de DESMOULIÈRE *(24)*.

N'ayant pu préparer nous-même l'antigène naturel (qui est, d'après l'auteur lui-même, préférable à l'artificiel plus facile à préparer) dont la préparation nécessite du foie humain et de la cholestérine gauche pure, extraite du cerveau humain, nous avons employé un antigène naturel "véritable" vendu dans le commerce.

Nous avons, afin de connaître sa valeur, essayé cet antigène en usant pour cela, non de la réaction type de Desmoulière (à 2 tubes de réaction : l'un au Desmoulière, l'autre à l'extrait de foie hérédo et contenant de très faibles quantités de complément qui en font une réaction très délicate) *(20)* mais comme GOUGEROT et PEYRE *(35)*, d'un dispositif de Calmette-Massol : nous avons employé les 3 tubes de réaction comportant des doses croissantes de complément, en présence de l'antigène de Desmoulière.

Nous avons employé la dilution antigénique à la dose unique de 0 cc 3 et préparée selon Desmoulière, par dilution de l'extrait alcoolique, dans 15 fois son volume de sérum physiologique à 30° C (ce mode opératoire évite en effet la précipitation de la cholestérine).

Nous avons préféré ne pas employer de bicarbonate de soude dans nos réactions ; on sait en effet qu'une dilution isotonique de ce sel (15 ‰) est souvent employée dans la R. de

Desmoulière à la dose de 0,10 pour atténuer le pouvoir anticomplémentaire de l'antigène, et augmenter la force du complément.

Expérimentant cette addition de bicarbonate de soude au Calmette-Massol en nous servant de l'antigène de Desmoulière, et sur des sérums négatifs, il nous a semblé qu'elle n'agissait pas de la même façon en présence de tous les sérums, compléments et antigènes, et il nous a paru que certains résultats inexacts pouvaient provenir de cette alcalinisation du milieu.

D'ailleurs, ANDREESCO *(1)*, étudiant « le rôle du bicarbonate de soude dans la réaction de fixation du complément », a montré que « le pouvoir anticomplémentaire des sérums coïncide avec une hyperalcalinité prononcée de ces sérums, et que tout porte à croire que ce sont les bicarbonates en excès, formant la majeure partie de la réserve alcaline, qui rendent les sérums anticomplémentaires »...

Le pouvoir anticomplémentaire de l'antigène que nous avons employé dans nos essais, était égal ou supérieur (suivant le complément employé) à 0,05 de complément à 40 % (procédé de titrage de Desmoulière).

Pour nos essais nous avons respecté à la lettre les « conditions indispensables à la bonne marche de la réaction de Desmoulière » exposées par LOPEZ-RUIZ, élève de WEISSENBACH *(53)*.

Ces conditions font, de la méthode, une suite de réactions très délicates qui, bien faites, donnent des résultats excellents.

Nous avons cependant obtenu des réactions faiblement positives avec de nombreux sérums que les autres réactions montrent négatifs ; il appartiendrait à la clinique de les expliquer ou les rejeter.

Nous donnerons deux exemples types de l'intérêt de la méthode :

SÉRUM 21 (*signes cliniques p. 91*) :

R. : + + — C.M. : + ± — K. : — — — Desmoulière : + + +

SÉRUM d'un syphilitique tertiaire traité depuis plusieurs années, après une interruption de traitement de 12 mois.

R. : + ± — C.M. : + — — K. : + — — Desmoulière : + + +

et rappellerons la conclusion d'un travail récent de WEISSENBACH - BASCH et MARTINEAU *(92)* sur cette réaction : « La R. de D.

pratiquée dans les conditions strictes de technique (que rappellent les auteurs) doit figurer au nombre des réactions sérologiques usuelles de la syphilis, aux côtés des réactions de B. W. et de H. et d'une réaction de floculation (Vernes-Kahn) ».

Malheureusement un gros ennui à l'application de cet antigène à notre réaction réside dans la nécessité de toute une série de titrages préliminaires, que nous évite l'emploi de l'antigène de Bordet Ruelens dépourvu de tout pouvoir anticomplémentaire. Nous avons cependant essayé cet antigène dans notre réaction après titrage par la méthode classique du pouvoir anticomplémentaire de l'antigène, de la force du complément et neutralisation du pouvoir anticomplémentaire de l'antigène par la quantité voulue de complément ; nous n'avons obtenu aucun résultat intéressant. Sans doute serait-il nécessaire de déterminer ces équivalences à l'aide du système employé dans notre réaction, ce qui serait très long et très délicat... il se pourrait même que, étant donnée la longueur des opérations, certains constituants du système, en particulier le complément, changent de valeur, apportant une grave cause d'erreur... de plus l'alcool de l'extrait a peut-être une action sur le mécanisme de notre réaction et l'opalescence apportée au milieu en réaction par la dilution antigénique nécessiterait une correction...

2 - *ESSAI d'AUGMENTATION de la SENSIBILITE de la METHODE par l'EMPLOI du LIQUIDE de RINGER-LOCKE.*

La nature vraie des sérums syphilitiques est encore inconnue.

L'étude des constituants chimiques du sérum, dans les variations desquels on comptait trouver la cause de la positivité de la réaction de W., n'a pu encore expliquer cette réaction.

Ainsi, la cholestérinémie ne semblait plus devoir être mise en cause après les travaux de Gaucher, Paris, Desmoulière (1912) *(34)* de Craig et Williams (1922) *(18)* de Bory *(9)* de Weissenbach et Martineau (1932) *(93)* de Floris (1933) *(33)* établissant que la raison déterminante du phénomène de W. ne réside pas en la cholestérine du sang... cette question semble se trouver à nouveau soulevée par un travail récent de Bernard et van den Branden *(6)* (1936) établissant sur 4 malades que l'irréductibilité de leur B. W. est due à un taux anormal de la

cholestérine dans le sang, attendu que, chez chacun, et en dehors de tout traitement spécifique, la courbe du W. a suivi celle de la cholestérine.

On a aussi signalé un trouble du seuil normal du sucre sanguin (hyperglycémie) chez les syphilitiques à jeun, ainsi qu'un trouble du métabolisme des hydrocarbures... des réactions de W. non spécifiques dans la glycémie, dans le diabète sucré... il ne semble pas cependant qu'on doive retenir une influence de la glycémie sur la R. de W.

La question des albumines du sérum se montre aussi des plus complexes.

Bory *(10)* émet, en 1918, l'hypothèse que les sérums syphilitiques doivent à un excès de globuline le caractère positif de leur réaction en présence de l'antigène P. — Ronchèse *(76)* pense que « ce qui rend positif un sérum syphilitique, c'est un déséquilibre existant entre deux éléments antagonistes » qui seraient des albumines du sérum : globuline, sérine...

Bory et B. Guérithault *(11)* montrent dès 1919 que la globuline ne peut intervenir dans la réaction par surcharge globulinique des sérums, la teneur et les rapports entre elles des albumines du sérum entre les syphilitiques et les sujets sains ne différant pas.

La question n'en est pas pour cela résolue, et elle se complique du fait de la distinction, par Weissbach *(41)*, des globulines thermolabiles et thermostabiles ; ces dernières seraient seules augmentées dans la syphilis aux dépens des thermolabiles, la quantité globale n'étant pas modifiée... et de l'hypothèse de Bory *(9)* que « si la globuline intervient dans le W. positif, ce n'est pas par surcharge de globuline, ni par une modification quantitative de celle-ci, mais parce qu'il existe probablement, dans les sérums normaux, une substance qui s'oppose normalement au pouvoir déviant de la globuline en présence des lipoïdes de l'extrait antigène ; et cette substance (qui pourrait d'après l'auteur être lécithine ou savons) ferait défaut dans les humeurs du syphilitique »... hypothèse dont s'écarte, il est vrai, celle de C.-L. Ducco (de Buenos-Ayres) — (citée par Brousse *(12)*) — qui aurait découvert dans le sérum syphilitique une albumine spéciale dont le pHi est aux environs de 8...

De plus Mladen Paic ayant montré que « les sérums humains normaux ne se distinguent pas, par leurs spectres d'absorption dans l'ultraviolet, des sérums des sujets syphilitiques » *(67)* qu' « il n'y a pas de différence notable, ni au point de vue qualitatif, ni au point de vue quantitatif, entre la dispersion rotatoire des sérums normaux et syphilitiques *(68)* », que l' « indice de réfraction global des sérums ne permet pas de discerner les sérums normaux des sérums syphilitiques » *(69)* conclut que « les sérums de syphilitiques ne se distinguent certainement pas des sérums normaux par la teneur en protéïnes » : il n'a constaté, en ce qui concerne la nature chimique de ces substances, aucune différence.

Les constantes physiques des sérums syphilitiques semblent mieux établies.

Kopaczewski *(45)* - Lecomte de Nouy - Chevrel-Bodin, Cormier *(16)* ont suffisamment établi que la R. de B.W. coïncide dans les sérums syphilitiques avec une variation de la tension superficielle.

Kopaczewski *(46)* signale aussi dans les humeurs syphilitiques « l'interversion de la charge électrique d'une portion des colloïdes les plus labiles » ; Chevrel-Bodin, Cormier « des modifications de charges », et pour eux la floculation serait « un phénomène dont l'importance est proportionnelle à la différence des charges introduites dans la réaction par le sérum » *(16)*.

Ainsi, de plus en plus, le mécanisme de la R. de W. semble s'apparenter, non pas à la théorie immunologique de Bordet-Gengou mais plutôt à un processus physico-chimique incomplètement connu.

Dès lors nous avons pensé qu'il fallait chercher à respecter le plus possible, dans la R. de W., cet état physico-chimique en opérant en milieu isotonique se rapprochant au plus de celui du sérum sanguin.

L'eau physiologique ne répond pas exactement à ces données, son pH est inférieur à 7, sa constitution est assez éloignée de celle du sérum sanguin. Nous avons pensé opérer avec un de ces sérums minéraux que, depuis les débuts du siècle, les physiologistes (Carrel en particulier) emploient comme milieu liquide de vie pour les organes d'animaux ou la circulation artificielle, liquides dont les propriétés qui en font un véritable sang artificiel, ont permis

depuis longtemps l'emploi en thérapeutique [Capitan (1906) *(15)*].

Nous avons choisi le liquide de Ringer-Locke dont nous rappellerons la formule simplifiée :

Chlorure Na : 8 gr.
Chlorure K : 0,2
Bicarbonate Na : 0,2
Chlorure de Ca : 0,2
Glucose : 1 gr.
Eau distillée qsp. : 1.000 cc.

Nous espérions que ce liquide, maintenant plus exactement que l'eau physiologique à 9 o/oo en NaCl l'équilibre des constituants du sérum, pourrait nous permettre d'obtenir une plus grande sensibilité de la réaction et l'usage de très petites quantités de sérum.

Le liquide de Ringer employé avait un pH variant entre 7 et 7,4. Nous avons fait avec lui, comparativement avec l'eau physiologique, tant en ampoules scellées qu'à l'air libre, l'essai du chauffage à 56° pendant 30 minutes de dilutions de sérums syphilitiques aux 1/3-1/5e-1/10e; les résultats obtenus aux méthodes de contrôle furent identiques : il ne semble donc pas que la dilution au Ringer empêche les transformations physico-chimiques apportées par le chauffage.

Nous avons essayé aussi, comparativement, les R. - C. M. - K. en présence d'eau physiologique et de Ringer ; les dilutions des constituants et le lavage des globules étant faits avec chacun des liquides en expérience.

Le R. et le K. nous ont donné quelques résultats plus nets au Ringer ; nous n'avons pas remarqué au C. M. de différences dans les réactions menées avec ces mêmes solutions en se basant sur des titrages opérés avec les 2 liquides.

Opérant comparativement notre réaction en présence de Ringer et d'eau physiologique, nous n'avons pas remarqué de différences notables dans les résultats obtenus. Cependant, opérant sur des sérums positifs très dilués afin de déterminer la limite de leur positivité, nous avons remarqué que, tandis que la plupart donnaient les mêmes résultats en présence des deux liquides, quelques-uns demeuraient positifs à une dilution plus grande avec le Ringer qu'avec l'eau physiologique. L'augmenta-

tion de sensibilité viendrait sans doute d'une plus grande résistance des hématies de mouton en présence du Ringer, résistance retardant l'hémolyse ; on remarque en effet, que les tubes et témoins de réaction sont moins hémolysés dans les mêmes conditions opératoires en présence du Ringer que de l'eau physiologique.

Ce procédé n'apparaît donc guère plus sensible et ne semble pas devoir être retenu, d'autant plus que le fait d'avoir à stériliser le Ringer à froid par filtration au Chamberland *(14)* apporte à la réaction une nouvelle complication.

De ces essais au Desmoulière et au Ringer, il résulte donc qu'il ne faille songer, pour augmenter la sensibilité de la méthode sans nuire à sa spécificité, qu'à la diminution de la force hémolytique du système... la méthode est, comme nous l'avons dit, très souple à ce point de vue... mais il sera sans doute toujours impossible d'obtenir avec un seul complexe anti-mouton le maximum de sensibilité pour tous les sérums.

IV. — Mesure de l'Hyperpositivité :

Sur 28 sérums très positifs examinés à la méthode, 11 donnaient la positivité maxima (95 à 100) : les tubes réaction ne donnant pas d'hémolyse appréciables à la cellule, notre méthode ne pouvait les séparer.

Il est cependant intéressant de mesurer l'hyperpositivité de ces sérums à équilibre ultra perturbé pour en déterminer le potentiel syphilitique et contrôler l'action des traitements.

De nombreux procédés s'offrent pour cela :

1°) Elévation de la température de réaction ou augmentation de la durée du contact à 15°C.

Ces procédés ne sont pas à retenir, le premier car il semble nuire à l'exactitude de la méthode, et le second : parce que la réaction est déjà très longue.

2°) Emploi de doses croissantes d'antigène P. :

Ce procédé ne nous a pas donné de résultats constants avec les divers sérums, et on a signalé que l'antigène agirait en présence de sérums fortement positifs à des doses infinitésimales par une seule action de présence.

3°) Renforcement du système hémolytique :

a) Nous avions pensé opérer des additions de complément ou de sensibilisatrice en cours de réaction ; après une première mesure faite avec une partie aliquote du liquide en réaction au temps X... et déterminant tous les sérums positifs, nous ajoutions au pouvoir hémolytique, et après un nouveau temps de contact, nous faisions une nouvelle mesure.

Ces additions en cours de réactions ne donnent pas de résultats réguliers : il y a sans doute des perturbations amenées dans la température par ces additions, et nous ne connaissons pas l'action que peut avoir sur ce complexe en réaction depuis plusieurs heures, une telle addition.

b) Nous avons voulu utiliser, pour chaque sérum, deux complexes hémolytiques, l'un faible et spécifique, l'autre fort pour séparer les sérums très positifs; mais un seul complexe ne permet pas de séparer les uns des autres les sérums hyperpositifs avec assez d'exactitude.

c) Le procédé opérant par augmentation progressive de complément et d'hémolysine ne peut être poussé assez loin sans amener des perturbations causées sans doute par l'augmentation des albumines étrangères.

4°) Doses décroissantes de sérum humain :

C'est là le procédé de choix, qui, indiqué par Calmette, a été repris par Dujardin.

Peyre *(71)* le pratique par dilution du liquide à examiner dans l'eau physiologique à 9 o/oo, « il recherche la dilution limite contenant la quantité d'anticorps nécessaire et suffisante à la constitution du système fixateur, capable autrement dit de donner la réaction positive ».

Partant de ce procédé, nous avons fait notre réaction avec 0 cc. 20 de dilutions à des taux variables de sérums fortement positifs dans l'eau physiologique, et avons déterminé la dilution limite maintenant la complète positivité du sérum (on pourrait aussi déterminer la dilution limite négativant le sérum).

Ainsi, le sérum 17 *(p. 90)*, sérum le plus fortement positif que nous ayons rencontré, donnait, dans ces conditions :

Pur.	100	au 1/40e	79
Au 1/5e	100	au 1/60e	71
Au 1/10e	100	au 1/80e	54
Au 1/20e	86	au 1/120e	0

Le gros intérêt de cette méthode des dilutions réside dans la disparition progressive du pouvoir " anticomplémentaire " avec la dilution. Ainsi, un sérum légèrement anticomplémentaire donnant pur une hémolyse du témoin = 83, donnait, au 1/4 : = 141, au 1/8e : = 153.

Le sérum 17 *(p. 90)*, très " anticomplémentaire " qui, pur, donnait au complexe faible un témoin inférieur à 20, donnait, au 1/5e : = 76 ; au 1/20e : = 130 ; au 1/40e : = 139...

Cela est d'autant plus intéressant que les sérums très fortement anti-hémolytiques que nous avons examinés étaient, pour la plupart, des sérums très positifs... il est donc très indiqué, lorsqu'on rencontre des sérums très positifs au R. et au K. d'opérer directement la réaction étudiée avec des dilutions... cela permettra, dans le cas de certains sérums antihémolytiques très positifs, de pouvoir opérer avec le complexe faible, qui, nous l'avons expliqué, est plus sensible.

V. — Fidélité de la méthode :

La méthode proposée est d'une grande fidélité et nous avons montré p. 76, comment, en opérant avec un minimum de soin, des réactions répétées à quelques heures d'intervalle donnent des résultats très comparables.

X. — ETUDE DES CONSTITUANTS DE LA REACTION

Tous les réactifs entrant en jeu dans le B.W. classique sont instables et leur activité se modifie avec le temps. C'est ce qui rend si difficiles les comparaisons entre les diverses séries d'examens puisqu'on ne peut les faire avec des réactifs d'activité constante.

Dans ce chapitre nous n'avons pas voulu faire une étude complète de ces divers réactifs ; nous nous sommes seulement proposé d'étudier les divers constituants du B.W. dans leurs rapports avec les essais exposés ci-dessus et avec la réaction proposée.

I — Le Complément

L'étude de l'activité complémentaire d'un sérum se trouve facilitée par l'emploi de la cellule photoélectrique.

Le procédé classique de titrage du complément dérivé du Wassermann type n'est pas très exact et nécessite une grosse quantité de sérum étudié.

En mesurant, sur le complexe proposé pour la réaction étudiée et où on remplace le sérum de malade par de l'eau physiologique, les variations de densité optique, après un temps déterminé d'exposition à 15°C., la concentration en sérum hémolytique étant maintenue constante, l'hémolyse finale est fonction de l'activité du complément introduit.

Lors des premiers essais de notre travail, les quantités de sérum de cobayes employées étaient très importantes, aussi avions-nous pensé à remplacer le sérum de cobaye par d'autres substances.

Nous n'avons retenu ni les " alexines synthétiques " qui ne semblent pas encore au point ; elles ne feraient, d'après SCHMIDT *(86)* aucune différence entre les globules ordinaires et sensibi-

lisés ; ni les compléments de lapin ou d'homme qui nécessitent de grosses quantités de sérum et introduisent par là des quantités importantes d'albumines étrangères dans la réaction.

Nous avons expérimenté en vain les albumines de l'œuf et du lait... et nous sommes revenu au sérum de cobaye qui occupe la première place quant à la teneur en complément parmi les diverses espèces animales, et a l'avantage d'être très pauvre en sensibilisatrice hémolytique anti-mouton.

Nous avons montré la nécessité pour la méthode présentée, d'opérer toujours avec des compléments identiques. Nous avons pensé obtenir ce résultat par la conservation...

Ne connaissant pas assez la méthode en expérience, nous avons rejeté à priori les nombreux procédés chimiques de conservation susceptibles d'introduire dans une réaction très délicate des causes d'erreurs.

Le sérum desséché donnant des résultats inconstants et diminuant d'activité avec le temps, nous avons essayé la dessiccation et conservation au vide qui nous ont permis une conservation plus longue, mais non une stabilisation du complément. La fixation par dessication sur coton hydrophile a considérablement atténué le pouvoir complémentaire des sérums.

La conservation à des températures très basses prolongerait, d'après de nombreux auteurs, la vie du complément, mais ces procédés compliqués ne semblent pas non plus le stabiliser ; il en serait de même du meilleur procédé actuel de conservation, qui est aussi le plus simple, celui de Ronchese *(77)* (sérum en solution salée hypertonique de NaCl et sunoxol) qui, pendant quinze à vingt jours garderait un pouvoir complémentaire suffisant pour les réactions classiques d'hémolyse.

Devant l'impossibilité de conserver stable une quantité donnée de complément, il nous était nécessaire de déterminer le cycle du complément dans le sérum de cobaye afin de connaître dans quelles conditions nous devions l'employer pour opérer nos diverses manipulations avec un complément le plus égal possible.

Nous avons aussi cherché la manière d'obtenir le sérum de cobaye le plus riche en complément de façon à n'introduire dans la réaction que le minimum d'albumines étrangères, ceci sans recourir aux procédés d'enrichissements artificiels du sérum :

soit in vitro : bicarbonate de soude (qui d'ailleurs à partir d'un taux fixé par ANDREESCO *(1)* diminue, puis inactive le complément) ;

soit in vivo : par injection aux cobayes de bicarbonate de soude, de substances médicamenteuses (pilocarpine, salvarsan, sels de mercure), de plasma sanguin, bouillon, caséine, nucléine, produits pathologiques...

procédés qui ne semblent avoir qu'un intérêt théorique.

Cette étude s'avérant très délicate et sujette à erreurs du fait des très nombreux facteurs qui influent sur la teneur en complément du sérum de cobaye, nous avons d'abord étudié ceux-ci afin d'écarter le plus possible toutes causes d'erreurs étrangères à la méthode.

VARIATIONS DU POUVOIR COMPLEMENTAIRE DU SERUM DE COBAYE :

A) IN VIVO

1°) Avec l'individu :

Les auteurs (MASSOL-GRYSEZ *(55)*, etc...) signalent et c'est un fait d'expérience que le pouvoir complémentaire des sérums de cobaye diffère avec les individus ; aussi est-il classique d'opérer avec un mélange au minimum des sérums de trois animaux.

2°) Avec l'hérédité :

En plus des influences individuelles, semble jouer une question d'hérédité. Ainsi NICE, NEILL et MOORE *(65)* signalent le cas de 22 cobayes d'un même élevage, très pauvres en complément, — RUEDIGER *(82)* montre que l'élevage des seuls cobayes donnant des compléments forts améliore beaucoup les résultats obtenus, ce serait là un moyen d'obtenir des compléments plus uniformes.

3°) Avec le sexe :

Le sérum des femelles et surtout des femelles pleines ou en

lactation est à peu près dépourvu d'activité complémentaire et souvent inutilisable (Demanche *(22)* Desmoulière *(25)*).

De plus on a signalé des sérums de femelles dont le pouvoir complémentaire est affaibli au contact d'antigènes syphilitiques n'ayant aucun pouvoir anticomplémentaire vis à vis de la majorité des sérums de cobaye, et le cas de sérums de femelles gravides (embryon dans chaque trompe utérine) se comportant comme de véritables sérums positifs (Ranque-Senez et Vayssière *(74)*) propriété sans doute due à la présence dans le sérum de l'animal d'anticorps spéciaux et étrangers au complément proprement dit.

Dès lors nous avons éliminé toute femelle de nos séro-réactions : cela semble d'autant plus nécessaire que chez le cobaye le portage (plus de deux mois) et la période de sevrage (deux mois) sont fort longs.

4°) Avec l'alimentation :

Hilgers *(38)* constate que chez les cobayes sous-alimentés le titre en complément est réduit.

Bonanno *(7)* étudiant l'influence sur le pouvoir complémentaire d'une alimentation capable de mettre des cobayes en état d'alcalose ou d'acidose, signale dans ce dernier cas au bout de 20 jours une forte diminution du complément dans le sérum des cobayes.

Ronchese *(76)* signale que « quand le cobaye a mangé, le complément se trouve dans le sérum en plus grande quantité qu'à jeun, mais est moins fixe ». Les auteurs sont d'accord pour recommander d'opérer avec un sérum prélevé hors de la période digestive.

Nous avons remarqué, opérant sur des sérums de cobaye pris durant la digestion, une hémolyse moindre (dans les tubes témoins d'hémolyse) dans le tube avec antigène que dans celui sans antigène. Nous avons dès lors opéré nos réactions avec des sérums de cobayes ponctionnés après environ douze heures de jeûne et nourris avec une alimentation variée et égale : fourrages verts et secs, grains divers, légumes.

5°) Avec l'état de dépression des cobayes :

Hansson *(37)* n'a décelé aucune différence appréciable du titre en complément entre des cobayes normaux et tuberculeux ;

il attribue une élévation du titre alexique chez ces cobayes lors des derniers titrages aux saignées répétées.

Les examens de deux sérums de cobayes rendus tuberculeux par injection de crachats à B.K., nous ont donné des sérums plus faiblement complémentaires que ceux de la moyenne de nos cobayes.

Opérant par ponction du cœur des prélèvements de 5 à 7 cc. de sang tous les trois à quatre jours sur un cobaye, jusqu'à la mort, nous avons remarqué une baisse du pouvoir complémentaire chez ce cobaye.

H. Vincent *(90)* ayant soumis des cobayes à une fatigue continue et grave prouve que le surmenage aigu et prolongé détermine un abaissement parfois considérable du pouvoir alexique du sérum de cobaye.

Nous n'avons prélevé nos compléments que par ponction intracardiaque, « cette petite opération étant tout à fait inoffensive lorsque la quantité de sang prélevée ne dépasse pas 10 cc. pour les cobayes de 500 grammes » *(14)*, ce procédé nous a permis d'économiser un matériel parfois difficile à se procurer.

Nous avons toujours opéré sur des cobayes adultes mis au repos environ un mois depuis le dernier prélèvement.

6°) Avec la saison :

Nous avons remarqué chez les cobayes venant de l'extérieur un pouvoir complémentaire plus faible durant les mois froids. Nous pensons que cela provient, plutôt que de la saison, du froid que les cobayes redoutent ou d'une alimentation moins riche en légumes verts.

B) In vitro

De nombreux facteurs interviennent en plus des deux facteurs primordiaux que sont la température et l'âge.

On a signalé l'influence inhibitrice :

— de la lumière solaire (Buchner) ;

— des rayons ultra-violets (Abelin et Stiner - Baroni et Jonesco - Petterson *(70)* ;

— de certaines conditions atmosphériques et météorologiques : (orages, forte élévation de la température extérieure) (Jame et Jude *(40)*) ;

— peuvent intervenir aussi dans sa manipulation l'action de l'agitation (COURMONT et DUFOURT), du milieu : l'action optima d'un complément s'exerçant dans un milieu dont l'alcalinité est égale à celle du sang (MICHAELIS et SKWIRSKY), de la dilution qui fait baisser plus rapidement son activité (aussi suivant MEERSEMANN *(60)* n'opérons-nous nos dilutions qu'au moment de l'emploi).

DU MODE DE PREPARATION ET DE CONSERVATION DU SERUM DE COBAYE AVANT L'USAGE :

Etant données les variables exposées plus haut, on ne peut s'étonner de voir, selon les auteurs, différer le mode de préparation et le temps optimum d'emploi du sérum de cobaye, d'autant plus qu'ils ne semblent d'accord ni sur la période du cycle du complément où celui-ci atteint son taux maximum, ni sur celle de sa stabilisation.

Ainsi SILBERNSTEIN-RAPPAPORT et PISTINER *(87)* signalent que la teneur du sérum en complément augmente pendant les 3 ou 4 premières heures de coagulation du sang in vitro et diminue ensuite pendant quelques heures ; alors que DOLD et KLINGHART *(41)* pensent que le pouvoir complémentaire s'abaisse pendant les 4 premières heures, augmente dans les 2 heures qui suivent, et atteint son maximum au bout de 6 heures ; que pour DEMANCHE *(22)* « l'activité du sérum, faible et irrégulière dans les premières heures qui suivent la saignée, n'atteint son maximum et ne se stabilise qu'au bout de 24 heures ; décroît ensuite rapidement et disparaît au bout de 3 à 4 jours, même à la glacière. »

D'autres auteurs formulent des opinions différentes..., il en résulte de nombreux procédés de préparation du complément, soit pour l'obtenir plus actif, soit pour l'obtenir plus stable. Ainsi :

DEMANCHE *(22)* laisse le caillot se rétracter à la température du laboratoire pendant 6 heures, le garde pendant 12 heures à la glacière, recueille le sérum par centrifugation, le conserve à la glacière à + 4°C et l'utilise dans les 48 heures.

L.-F. MORRISON *(62)* prétend que le complément est plus actif préparé par défibrination et séparation des globules qu'en ne le centrifugeant selon une méthode répandue qu'après un contact de 24 heures avec le caillot.

Meersemann *(60)* recommande aussi ce procédé et utilise le sérum le jour même.

Ronchese *(76)* porte le sang de cobaye 10 minutes à 37°, le centrifuge, le conserve à la glacière et l'emploie dans les 24 h.

Les auteurs ne s'entendent pas davantage sur la conservation du pouvoir complémentaire du sérum dans le temps ; il faut voir encore là sans doute l'influence de toutes les causes de variations si difficiles à éviter, que nous avons citées.

— A la température de la glacière :

Massol et Grysez ont établi que le sérum de cobaye perd 60 % de sa teneur en complément en 8 jours et 90 % en 15 jours *(73)*, résultat sensiblement confirmé par Pierret et Breton *(73)* qui remarquent que sa valeur passe de 1 à 0,33 en 8 jours, à 0,25 en 3 semaines.

— A la température ordinaire, Ronchese *(76)* signale que le complément baisse de moitié en quelques heures.

D'après Ruediger *(82)* le complément peut être maintenu actif pendant 8 semaines à 0°F (environ — 18°C), durant plus de 4 semaines, salé et à plus 1°C — d'après Thomson *(cf. 76)* il resterait actif pendant plusieurs mois à la température de — 15°C.

Ces résultats ne nous renseignent pas sur le cycle du pouvoir complémentaire dans le sérum de cobaye, aussi nous sommes-nous proposé de déterminer les meilleures conditions pour obtenir un complément fort et voir s'il est possible de le considérer comme stable pendant un temps donné.

Ce travail n'a pû être poussé étant donnée notre pauvreté en animaux de laboratoire.

Dans un essai préliminaire, nous avons saigné à blanc un fort cobaye et préparé son sérum selon les diverses méthodes exposées plus haut : Morrison, Demanche, Ronchese et les deux procédés classiques suivants :

1°) laisser cailler le sang à la température du laboratoire, centrifuger aussitôt et employer après 24 heures de glacière ;

2°) laisser cailler à la température du laboratoire, laisser 24 heures sur le caillot à la glacière, et centrifuger au moment de l'emploi.

Les 5 produits en expérience sont conservés à + 2°C et 24 heures après la prise de sang on fait la mesure, que l'on renouvelle encore après 24 autres heures.

Tous les sérums ont accusé sensiblement le même pouvoir complémentaire ; les méthodes : de MORRISON et (1°) ont accusé un chiffre légèrement supérieur, et, ces méthodes, les plus simples, semblent avoir l'avantage de donner un sérum très clair : ce sont elles que nous avons employées.

Pour déterminer, à partir du sérum ainsi préparé, le cycle du complément, nous avons cherché à éliminer le plus possible toute variation étrangère au vieillissement à plus 2°C en fixant très exactement les conditions opératoires.

Les cobayes adultes mâles, élevés à la température de 15 - 20°C avec une nourriture abondante et variée, sont maintenus à jeun pendant 12 heures, saignés (minimum 3 cobayes) par ponction aseptique du cœur (5 à 10 cc. selon le poids et en espaçant d'au moins un mois les prises de sang). Le sang recueilli dans un vase stérile, est défibriné par agitation ou laissé coaguler, puis centrifugé aussitôt. On le conserve à la glacière à + 2°C entre les différents essais ; les dilutions ne sont faites qu'au moment de l'emploi.

Pour pouvoir faire la mesure de l'hémolyse après 2 heures de réaction à plus 15°C nous avons opéré avec une dose d'hémolysine forte. — Nous rappelons la formule du mélange en réaction:

Tube avec antigène :		*Tube sans antigène :*	
E.P.	0.60	. . . . .	0.90
Antigène à 1/10e. .	0.30	. . . . .	0
Cpl. à 1/5e.	0.35	. . . . .	0.35
S.H. (dilution). . . .	0.75	. . . . .	0.75
Globule.	1	. . . . .	1

Nous donnerons schématiquement les résultats obtenus avec les sérums de 3 cobayes (1-2-3) et leur mélange à p.e. : (4) :

1) mâle. . . . . 670 gr. saigné il y a 1 mois ;
2) mâle. . . . . 460 gr. n'a jamais été saigné ;
3) mâle. . . . . 630 gr. id.

Nos réactions ne sont mises en route qu'environ deux heures après la prise de sang, temps nécessaire pour préparer les sérums de cobayes, les dilutions de réactifs, et les amener à + 15°C.

Âge du Complément.....	*2 h.*	*4 h.*	*6 h.*	*8 h.*	*10 h.*	*24 h.*
Cobaye 1 : Avec antigène . . .	167	173	x	173	177	161
Sans antigène . . .	179	176	176	174	171	165
Cobaye 2 : Avec antigène . . .	171	171	x	175	177	165
Sans antigène . . .	177	177	186	182	182	163
Cobaye 3 : Avec antigène . . .	170	182	x	184	189	165
Sans antigène . . .	175	175	177	173	176	167
Mélange 4 : Avec antigène . . .	168	173	x	170	174	167
Sans antigène . . .	173	178	174	175	189	163

Âge du Complément.....	*3 jours*	*7 jours*	*15 jours*	*21 jours*	*2 mois*
Cobaye 1 : Avec antigène . . .	139	x	45	36	*cultivé*
Sans antigène . . .	x	108	48	46	—
Cobaye 2 : Avec antigène . . .	134	x	44	25	3
Sans antigène . . .	145	113	53	24	2
Cobaye 3 : Avec antigène . . .	147	x	53	*cultivé*	—
Sans antigène . . .	148	107	53	—	—
Mélange 4 : Avec antigène . . .	129 (?)	x	35	18	0
Sans antigène . . .	141	88 (?)	26	20	0

D'après cet essai le complément semble (aux erreurs opératoires près) à peu près stable entre 2 et 24 heures.

Nous avons trouvé chez la plupart des compléments examinés une stabilisation presque complète jusqu'à 2-3 jours.

Chez d'autres, au bout de 48 heures, une baisse notable se faisait déjà sentir. Il en est de même du temps d'inactivation complète qui semble très variable (15 jours-1 mois)...

Peut-être sont intervenus dans certains de ces examens, des facteurs que nous ne connaîssons pas ou des variations extérieures que nous n'avons pu éviter. En tous cas nous avons préféré n'employer dans nos réactions que des compléments très frais, et avons toujours opéré avec des sérums de cobayes âgés de 12 à 24 heures.

Nous rappellerons à ce sujet que dès 1910 Massol et Grysez signalaient des variations dans la conservation, tant à la glacière que desséchés, entre les divers compléments et concluaient, d'accord avec H. Noguchi « qu'il est toujours préférable d'employer l'alexine fraîche et liquide » *(56)*.

*
**

Prenant toutes les précautions décrites pour le prélèvement, la conservation, l'âge, des divers sérums de cobayes employés, nous n'avons pas trouvé de grosses différences entre les pouvoirs complémentaires des différents mélanges de sérums. Nos témoins d'hémolyse fixés aux environ de 130 ont oscillé entre 100-140, se maintenant généralement entre 120-140 : cet écart ne semble pas gêner nos réactions.

On sait que tout décalage dans l'hémolyse entre les tubes témoins d'hémolyse avec antigène P. et ceux sans antigène entraîne une cause d'erreur dans la réaction. L'écart dépasse rarement 10 divisions. Cependant, nous avons trouvé 2-3 fois un fort pouvoir " empêchant " dans le tube contenant de l'antigène P. (atteignant 30-40 divisions de différence avec le tube témoin d'hémolyse sans antigène). Nous n'expliquons pas ces causes d'erreurs, d'autant plus que les mêmes compléments ne produisent pas ce retard en présence d'antigène au titrage du CALMETTE-MASSOL ; dans ce cas, il est nécessaire de recommencer la réaction avec un nouveau complément.

Il nous semble qu'une méthode dérivée de celle que nous employons pour le titrage du complément dans le sérum de cobaye pourrait rendre des services dans l'étude du complément humain.

Il suffirait, neutralisant l'action de l'hémolysine anti-mouton naturelle du sérum humain par l'emploi d'un système hémolytique anti-globules humains, d'introduire dans la réaction une quantité déterminée de sérum inactivé lapin-antihomme ; l'hémolyse obtenue, après un temps x de réaction à 15°C, et mesurée à la cellule, serait fonction du complément contenu dans le sérum étudié.

Nous avons signalé que la majorité des sérums " à pouvoir anticomplémentaire " que nous avons examinés étaient des sérums fortement positifs. VINCENT *(90)* a montré qu'un surmenage prolongé détermine un abaissement considérable du pouvoir complémentaire chez le cobaye ; et il émet l'hypothèse, que la perte de cet élément protecteur, pendant l'état de fatigue, diminuerait la résistance à l'égard de certaines infections microbiennes. BELLELI *(4)* a montré des relations entre le pouvoir complémentaire du sérum humain et différentes maladies : d'après lui, la

valeur du pouvoir complémentaire pourrait avoir une valeur de pronostic, du fait que l'équilibre du complément troublé au début de l'affection et au cours de celle-ci, revient, vers la fin de la maladie, entre des limites normales. Tout récemment, MM. A. et R. SARTORY, J. MEYER et Mme SAUTER, étudiant les causes sérologiques de certains symptômes cliniques chez des tuberculeux soumis à des injections de tuberculine brute, ont « constaté que ce fait est en rapport étroit avec l'équilibre des sensibilisatrices et des compléments » *(85)*... autant de travaux montrant l'intérêt du titrage du complément dans le sérum humain.

II. — Le Sérum Humain :

1) *INFLUENCE DU CHAUFFAGE :*

RONCHÈSE *(76)* a démontré l'existence réelle, (surtout dans les infections légères), d'une sensibilisatrice thermolabile : il éliminait de sérums donnant un B.W. négatif après destruction du complément par chauffage, ce complément par inactivation biologique et obtenait un résultat positif. Aussi les auteurs sont presque unanimes à reconnaître que le chauffage de 30 minutes à 56°C diminue fréquemment l'activité des " réagines " syphilitiques. Cette diminution n'étant pas régulière, les anticorps étant sans doute plus ou moins thermolabiles, on a pris l'habitude de joindre à une méthode au sérum chauffé, une méthode au sérum frais.

Nous avons essayé cette double réaction avec la méthode que nous exposons ; il est évident que l'emploi du sérum frais introduit dans la réaction une nouvelle variable sous forme du complément humain variant avec chaque sérum et chez le même sérum dans des examens espacés. Mais, comme le résultat de notre réaction est formulé par le chiffre d'un rapport entre les tubes témoins et de réaction, qui ne diffèrent que par la présence d'antigène, nous avons pensé que le chiffre du rapport ne devait pas changer à condition que l'hémolyse ne soit pas trop forte : d'ailleurs si elle était trop forte nous sortirions des concentrations d'hémoglobine pour lesquelles la fonction représentative de la concentration par rapport à la densité optique est une droite.

Nous n'avons fait que quelques essais comparatifs avec les mêmes sérums frais et inactivés et joignons les résultats des rapports obtenus caractérisant ces sérums à notre méthode ; résultats qui montrent l'intérêt qu'il y aurait à poursuivre ces essais.

					SÉRUMS	
					inactivés à 56° C	frais
Sérums négatifs	3				0	0
	4				— 3	— 7
	5				— 2	+ 9
		K.	C. M.	R.		
Sérums positifs	6	+ — —	+ ± —	+ + +	87	93
	7	+ — —	— — —	+ — —	25	13
	8	+ + +	+ + +	+ + ±	60	60
	9	± — —	+ — —	+ ± —	50	45

Nous avions pensé aussi ne pas recourir au chauffage pour l'inactivation du sérum humain, étant données les transformations qu'il apporte, et attendre la destruction du complément par vieillissement à la température du laboratoire ; mais RONCHÈSE *(76)* a montré que « beaucoup de sérums positifs à anticorps thermolabiles cessent d'être positifs trois jours après le prélèvement » alors qu'ils ont été recueillis et conservés aseptiquement ; de plus, les sérums ainsi traités acquièrent des propriétés fortement antihémolytiques : autant de faits qui rendent ce procédé inintéressant.

2 - *INFLUENCE DE LA CONSERVATION SUR LES SERUMS :*

Il est établi que la conservation des sérums frais fait naître un pouvoir anticomplémentaire et diminue leur teneur en anticorps syphilitiques.

Or, vu la difficulté de nous procurer des sérums de positivités variables, nous avons dû, à maintes reprises, employer pour nos mesures, des sérums inactivés datant de 15-20 jours. Nous voulions savoir si de semblables réactions se produisaient sur ces sérums.

Nos essais ont été faits sur des sérums manipulés aseptiquement et conservés à + 2°C. sans l'aide d'antiseptiques. Ils ont porté sur des temps ne dépassant pas 6-8 semaines ; il est en effet difficile, malgré toutes les précautions prises, de ne pas parasiter des sérums que l'on manipule souvent.

Il nous a paru que le chauffage avait stabilisé les sérums tant au point de vue pouvoir antihémolytique que " réagine ".

Nous n'avons remarqué que deux sérums qui aient sensiblement augmenté leur pouvoir antihémolytique par la conservation. Les sérums négatifs n'ont pas été touchés par la conservation ; la plupart des sérums positifs se conservent 4-6 semaines sans aucun changement de leur pouvoir anticorps syphilitique, cependant nous avons remarqué quelques sérums accusant une baisse sensible après 6 semaines de glacière ; 2 autres ont légèrement augmenté leur positivité : ces sérums n'ayant aucune culture apparente, il est difficile d'admettre un tel résultat et sans doute faut-il accuser ou une action de compléments différents sur ces sérums ou une erreur opératoire.

Les essais faits lors de l'établissement de la méthode avec des sérums conservés 2-3 semaines sont donc légitimes. Cependant nous pensons qu'il vaut mieux se servir le plus rapidement possible des sérums, même inactivés par chauffage, à moins de les conserver par le sunoxol, qui ne semble avoir aucune action sur l'hémolyse.

3 - *POUVOIR DU SERUM HUMAIN EMPECHANT L'HEMOLYSE EN L'ABSENCE D'ANTIGENE P.*

Fréquent, après inactivation par vieillissement ou chauffage, ce pouvoir est fort rare au prélèvement du sérum ; Eschbach et Duhot *(30)* opérant sur des sérums utilisés 6 heures après la prise ont montré « la présence absolument constante de l'alexine dans les sérums humains frais », ainsi que celle d'hémolysines (dans 8 % des cas cependant l'hémolysine anti-mouton manquait mais il y avait toujours alors une hémolysine anti-lapin) ; nous rappellerons aussi le manque d'ambocepteur hémolytique chez les nouveaux-nés (Mangeri *(54)*). Quelques rares sérums sont non seulement " analexiques " mais " antialexiques ", et dans ce cas ce serait d'après Eschbach et Duhot un pouvoir antihémolytique.

Seuls sont gênants pour notre réaction, qui emploie une quantité d'alexine et de sensibilisatrice assez importante mais opère à basse température, les sérums possédant un pouvoir empêchant prononcé que ne semble que très rarement leur donner un chauffage de 30 minutes à 56°, qui se contente d'atténuer le pouvoir hémolytique du sérum ; et les sérums qui révèlent un pouvoir empêchant après chauffage sont généralement ceux qui ne donnent pas ou presque pas d'hémolyse des témoins à la réaction de Rubinstein.

Mazza *(59)* a préconisé une méthode thermique pour supprimer ce pouvoir : il recommande pour la méthode classique, s'il n'y a pas hémolyse à 37° dans les tubes témoins, de porter l'ensemble de la réaction à 50° ; il suffirait donc, dans notre réaction, d'augmenter graduellement la température du système afin d'obtenir l'hémolyse voulue, mais cette manœuvre est très délicate.

Sachs *(83)* a proposé un moyen chimique pour supprimer ce pouvoir sur le sérum inactivé, par action de HCl N, puis de Soude N. Nous n'avons pas cru devoir en user, ces faits ayant été discutés, et craignant d'apporter par ce procédé des perturbations dans notre méthode.

Par contre nous regrettons de n'avoir eu connaissance qu'alors que notre rédaction était achevée des travaux tout récents d'Auguste. Cet auteur montre *(1 bis - 1 ter)* : que « la précipitation du sérum humain par l'acide chlorhydrique fournit un moyen commode de débarrasser grossièrement le sérum d'éléments inhibants qui diminuent la sensibilité de la R. de B. W. », que la fraction du sérum non précipitable par HCl a un pouvoir fixateur supérieur ou égal à celui du sérum entier en même temps qu'un pouvoir anticomplémentaire nettement inférieur. Il a mis au point une méthode de diagnostic dans le sérum débarrassé de la fraction précipitable par HCl (Calmette et Massol modifié) et Carrière, Bertin et lui *(15 bis)* en ont montré le très grand intérêt clinique.

Nous tenions à signaler tout l'intérêt de cette nouvelle méthode et regrettons de n'avoir pu essayer son application à notre procédé, où, à tous ses avantages cliniques, elle eut joint celui de diminuer le pouvoir anticomplémentaire des sérums examinés.

Nous avons montré comment, pour le moment, nous tournions la difficulté par l'emploi, dans le cas de sérum à pouvoir anticomplémentaire, de doses plus fortes d'hémolysine dont l'excès neutralise le pouvoir antihémolytique du sérum : il reste que ce complexe fort peut nuire à la sensibilité...

Nous rappellerons qu'il semble utile de ne jamais faire les prélèvements de sang pour B. W. en période de digestion, certains auteurs ont signalé des troubles à la réaction en agissant sur de tels sérums, Cl. Simon *(cf. 41)* a signalé que des résultats faussement positifs pourraient même être obtenus...

III. - L'Antigène P :

« L'antigène est l'élément fondamental dont dépendent la sensibilité et la spécificité de la réaction » *(20)*, aussi avons-nous cherché un antigène très sûr et toujours identique à lui-même.

GROUCHAUSKAÏA (1933) *(36)* a montré les discordances des résultats dans les R. de B. W. avec l'emploi des différents antigènes même standardisés. Il en conclut que l'unification du sérodiagnostic de la syphilis, d'après la méthode de l'instruction soviétique avec des antigènes standardisés, ne met pas à l'abri des réponses discordantes ; il pense que la cause réside en grande partie dans des propriétés individuelles de ces antigènes qui seraient le fait des instituts qui les préparent et qu'il faut standardiser, non seulement la méthode, mais aussi les ingrédients de la R. de B. W.

Devant de semblables résultats, nous avons pensé, dans ce premier travail, n'user pour les réactions d'hémolyse et l'essai de notre technique que d'un seul antigène, malgré les inconvénients d'un pareil procédé. En effet la sensibilité d'un antigène ne dépendant pas uniquement de ses qualités intrinsèques, mais dans une certaine mesure aussi des propriétés des sérums examinés, on a d'autant plus de chances d'avoir des résultats exacts que l'on emploie des antigènes différents.

En plus d'un antigène très spécifique de la syphilis, il nous fallait pour la facilité de notre réaction un antigène facile à préparer dans un petit laboratoire, donnant toujours un produit identique, dénué de pouvoir anticomplémentaire, se conservant longuement sans altération, et donnant un liquide transparent (afin qu'il n'apporte qu'une différence de densité optique insignifiante entre les tubes témoin d'hémolyse, avec et sans antigène).

Ce sont là les caractéristiques mêmes données par BORDET et RUELENS *(8)* de leur antigène syphilitique de l'Institut Pasteur de Bruxelles.

Nous remarquerons d'ailleurs que cet antigène a rallié en France la quasi unanimité des suffrages :

Il a paru à RONCHESE *(78)* " strictement spécifique " et " le plus sûr ".

MUTERMILCH *(63)* a remplacé par lui dès 1924 à l'Institut Pasteur de Paris « l'extrait alcoolique de foie hérédo (employé par Levaditi et Latapie), une longue expérience lui ayant montré

que, tandis que le premier de ces antigènes varie beaucoup d'une préparation à l'autre, quant à ses propriétés anti-complémentaires et antigéniques, l'antigène de Bordet-Ruelens possède le grand avantage de fournir des résultats très réguliers ».

MEERSEMANN *(87)*, DEMANCHE *(20)*, le placent parmi les meilleurs antigènes. Ed. PEYRE *(71)* l'emploie parce que le moins anticomplémentaire.

Nous avons montré la complication qu'apporterait à notre technique l'emploi d'un antigène à fort pouvoir anticomplémentaire comme celui de DESMOULIÈRE.

CARACTERISATION DE L'ANTIGENE EMPLOYE :

L'antigène de Bordet-Ruelens desséché à 37° dans un verre de montre pendant 24 heures donne, d'après ses auteurs, 8 à 10 milligrammes de résidu par centimètre cube. Nous avons préparé à des époques différentes 4 antigènes selon la technique type de Bordet-Ruelens, les extraits secs furent de : 6-9-9-14 milligrs.

Il faut sans doute voir là des différences causées par les divers cœurs de veau employés ou les températures auxquelles on fait l'épuisement. Nous signalons qu'un des antigènes donnant 9 milligrammes de résidu a acquis un pouvoir anticomplémentaire en un an ; l'antigène donnant 14 milligrammes d'extrait n'a acquis un pouvoir anticomplémentaire qu'après plus de deux ans : le second antigène donnant 9 milligrammes est resté stable jusqu'à épuisement après plus d'un an et nous nous servons depuis plus de 6 mois de l'antigène ne donnant que 6 milligrammes d'extrait.

Nos réactions ont toutes été faites, ainsi que les examens de contrôle, avec des antigènes donnant 6 ou 9 milligrammes d'extrait sec ; ils avaient tous deux la même sensibilité ; il ne semble donc pas utile de tenir compte de ces légers écarts dans la concentration de l'antigène en résidu sec entre les diverses séries de préparation, sans quoi il serait d'ailleurs facile de standardiser soit la poudre d'organe, soit l'extrait.

DE LA DILUTION DE L'EXTRAIT ANTIGENIQUE :

BORDET et RUELENS emploient pour les séro-diagnostics une dilution au 1/40e de l'extrait alcoolique (0,50 extrait + 2 cc. eau distillée, on porte dans 18 cc. d'eau physiologique), d'après eux le liquide obtenu « employé seul ou en présence d'un sérum

normal, quelle que soit la dose mise en jeu, ne provoque aucune fixation d'alexine » *(8)*.

Certains auteurs ont cependant remarqué que la dilution avec l'alcool est moins active et peut donner un léger pouvoir anticomplémentaire dû à la présence de l'alcool ; aussi nous ferons notre dilution par reprise, à l'aide d'un agitateur, d'1 cc. d'extrait après évaporation de l'alcool sur un verre de montre à l'étuve à 37°, par 1 cc. d'eau distillée et successivement 2 autres cc. d'eau physiologique, nous ajouterons par petites quantités 7 cc. d'eau physiologique en agitant vivement.

Pour augmenter la sensibilité des méthodes d'hémolyse de contrôle nous avons employé en effet une dilution au 1/10e ; il n'y a là aucun inconvénient lorsque l'antigène n'a aucun pouvoir anticomplémentaire comme nous le vérifions à chaque série d'examens, d'une part pour les méthodes de contrôle par les titrages (technique de Meersemann *(60)*) ; d'autre part, pour notre méthode, par les tubes témoins d'hémolyse (avec et sans antigène) qui doivent tous deux accuser à très peu de chose près la même densité optique après 4 heures de réaction à 15° C.

DE L'AGE DE LA DILUTION ANTIGENIQUE :

Chevrel-Bodin et Cormier *(16)* semblent « avoir apporté la preuve que la réaction de fixation de B.W. et les diverses réactions de floculation reposent sur un phénomène unique et essentiel de précipitation colloïdale » (cette idée est encore il est vrai combattue par certains) ; on a, d'autre part, remarqué qu'un vieillissement de la dilution antigénique troublait les résultats.

Malgré cela on ne formule guère pour la préparation des antigènes qui servent dans les méthodes de floculation à lecture indirecte que seraient les réactions d'hémolyse (??), les points de détails exigés pour donner toujours les mêmes propriétés physico-chimiques aux antigènes qui servent dans les méthodes de floculation.

Chevrel-Bodin et Cormier ont défini les conditions essentielles à exiger d'un antigène convenant à l'épreuve de la floculation, il est remarquable qu' « elles se trouvent réunies dans l'émulsion de Bordet-Ruelens par le seul fait de sa teneur en NaCl à 9 o/oo » *(16)*.

Nous avons indiqué à l'exposé de notre méthode (p. 82), comment nous opérions pour mettre toujours en réaction un anti-

gène du même âge ; pour avoir un antigène toujours identique nous opérons toujours la dilution par le procédé exposé plus haut.

IV. — L'Eau Physiologique :

Nous avons employé une solution stérilisée 30 minutes à l'autoclave (120°) de 9 grammes de NaCl pur dans 1.000 cc. d'eau distillée (en verre Pyrex). Son pH se maintient aux environs de 6.

V. — Les Globules de Mouton :

Opérant dans notre réaction en présence d'un fort excès de globules, nous employons la purée globulaire pure.

Pour cette raison il est nécessaire de manipuler les globules avec un soin extrême : ils sont donc prélevés à l'abattage, lavés à l'eau physiologique stérilisée, ramenés au volume du sang total et conservés avec une rigoureuse aseptie.

Comme il importe, afin que dans notre méthode les résultats de diverses séries de mesure soient comparables entre eux, que la résistance des globules à l'hémolyse soit toujours la même, nous avons étudié l'influence sur notre méthode des conditions de prélèvement des globules (que l'on ne peut toujours surveiller) et de leur conservation.

1°) *RESISTANCE A L'HEMOLYSE ET SUJET :*

On a signalé que la concentration globulaire et la résistance des globules de mouton à l'hémolyse varie avec l'animal et pour cette raison recommandé de prendre un mélange de sang de plusieurs origines, cela peut être difficile dans une petite ville.

Des essais faits à trois reprises différentes sur les sangs séparés de trois moutons et leur mélange à parties égales nous ont montré que dans les conditions de notre méthode, la densité optique des témoins d'hémolyse, préparés avec les globules de divers individus ou leur mélange, est la même.

2°) *RESISTANCE A L'HEMOLYSE ET CONSERVATION :*

Armand-Delille a signalé la conservation pratique des globules par une trace de formol et beaucoup de sérologistes usent de ce moyen.

Nous préférons utiliser le sang pur ; avec Levy-Bing et Dogny *(52)* nous pensons en effet que la « réaction de Wassermann est suffisamment complexe et délicate pour s'abstenir d'y

introduire une substance dont la présence et peut-être l'action sur le stroma globulaire ne sont pas à négliger », d'autant plus que nous employons de très fortes doses de globules, et que LASSEUR et SPILLMANN *(47)* étudiant « l'hémolyse par les sérums des animaux préparés » ont montré que « les hématies traitées par le formol exigent pour être hémolysées, une plus grande quantité de substances actives que les hématies non additionnées d'aldéhyde formique ».

Nous avons donc conservé les hématies de mouton à la glacière à + 2°C. Les essais de résistance des globules à l'hémolyse après conservation à + 2°C ont été faits sur des globules parfaitement relavés au moment de la réaction jusqu'à obtention d'un liquide surnageant le culot de centrifugation absolument clair.

Nous avons opéré, par mesure de la variation de densité optique sous l'action hémolytique du complexe que nous mettons en réaction dans notre méthode, sur des séries de globules de 24 heures, 7 jours, 14 jours ; chaque série comprenant les globules séparés de trois moutons et leur mélange à parties égales.

Les résultats ont été les mêmes pour les globules de 1 et 7 jours, ceux datant de 14 jours, qui furent d'ailleurs très difficiles à nettoyer parfaitement, accusèrent une résistance légèrement atténuée à l'hémolyse. Etant donnée de plus, la nécessité de globules aseptiques pour une réaction les exposant durant 4 h. à 15°C (conditions où les microbes se développent dans un tel milieu très rapidement), et la difficulté, en manipulant les globules tous les 3 à 4 jours pour les relaver, de les maintenir longtemps stériles sans employer un antiseptique que nous voulons éviter, nous n'avons opéré nos essais qu'avec des globules renouvelés chaque semaine, ce qui nous semble préférable.

VI. — Le Sérum Hémolytique :

Nous avons employé un sérum lapin anti-mouton.

« Il est très important de posséder un sérum hémolytique très actif, afin de n'avoir pas à en employer un volume trop considérable ce qui risquerait de troubler la réaction par l'addition d'albumines étrangères » *(22)*, et LASSEUR et SPILLMANN *(47)* ont montré que « les hématies traitées par des sérums très actifs sont en général beaucoup plus sensibles à l'action ultérieure de l'alexine », aussi nous avons cherché à obtenir un sérum de lapin

le plus riche possible en hémolysine anti-mouton ; et nous n'avons employé, dans tout notre travail, pour nos essais, que des sérums marchant primitivement, d'après le titrage classique, à des taux de 1/400 à 1/100.

Nous avons essayé de déterminer les meilleures conditions pour obtenir le maximum de sensibilisatrice hémolytique dans le sérum de lapin.

Les auteurs ne sont d'accord, ni sur la voie d'introduction des globules de mouton, ni sur le nombre et l'espacement des injections, la quantité à injecter,... ni sur l'espace de temps entre les injections et le prélèvement.

1°) *PREPARATION D'UN SERUM HEMOLYTIQUE FORT DE LAPIN ANTI-GLOBULES DE MOUTON :*

a) Influence du mode d'introduction des globules :

La plupart des auteurs pensent qu'il vaut mieux répéter les injections.

La voie sous-cutanée est généralement abandonnée comme dangereuse et moins active.

RONCHESE *(76)* recommande la voie péritonéale " plus facile " que la voie veineuse ; DEMANCHE *(20)* reconnaît la voie intra-péritonéale " plus sûre " mais " ne donnant pas de sérums de titre élevé ", il recommande ainsi que MEERSEMANN *(60)* (qui la trouve plus active), la voie intraveineuse bien que plus délicate du fait des phénomènes d'anaphylaxie.

Nous avons pratiqué les deux méthodes d'injection sur des lapins du même sexe et du même élevage ; injectant en doses progressivement décroîssantes (comme le recommande MEERSEMANN alors que DEMANCHE recommande les doses croîssantes), les mêmes globules, fraîchement prélevés et lavés, chez les uns dans la veine marginale de l'oreille, chez les autres sous le péritoine.

Nous avons opéré avec 4, 3, 2, 1 cc. de globules purs en injections espacées de 7 en 7 jours et prélèvement 4 à 7 jours après la dernière injection, en saignant les animaux à blanc par ponction aseptique du cœur.

L'injection de quantités décroîssantes de globules et les lavages très poussés des globules évitent les phénomènes de choc par voie intraveineuse.

Les concentrations en hémolysine ont été en général légèrement supérieures par la voie intraveineuse ; quoique nous obtenions, avec certains individus, des résultats plus faibles par voie intraveineuse que la moyenne des sérums obtenus par voie intrapéritonéale.

b) Influence du sexe :

Pratiquant les mêmes essais avec des animaux de sexes différents, nous avons remarqué qu'en général les mâles donnent une hémolysine plus forte, mais là aussi il y a des exceptions.

Il reste donc que le mode d'injection, le sexe, l'individu, influent sur les résultats obtenus ; il nous semble cependant que les sensibilisatrices les plus fortes sont obtenues par voie intraveineuse chez les lapins mâles.

2°) *CONSERVATION DU SERUM HEMOLYTIQUE :*

On a signalé que les sérums dilués conservent leur titre plus longuement que les sérums très concentrés en hémolysine.

Aussi avons-nous toujours dilué, pour la conservation, nos sérums à un même titre : par exemple, de façon à ce qu'ils soient à employer au 1/100 ; cette simple précaution permet d'éviter parfois des erreurs dans la préparation des dilutions.

Nous avons conservé les sérums hémolytiques à la glacière à + 2°C dans des petits flacons stériles bien bouchés et additionnés d'une trace de sunoxol. Nous n'avons pas remarqué de baisse sensible du pouvoir hémolytique en 6-8 mois.

3°) *TITRAGE DU SERUM HEMOLYTIQUE :*

Nous ne rappellerons pas le titrage classique du sérum hémolytique, nous avons emprunté la technique très simple de MEERSEMANN *(60)*, qui exprime le titre du sérum par le chiffre de la dilution la plus forte qui aura suffi à assurer à la dose de 0 cc. 1 l'hémolyse complète de 1 cc. d'hématies à 5 % en présence de 0 cc. 4 d'alexine au 1/10e et de 1 cc. 5 d'eau physiologique après 30 minutes de contact à 37°C.

La méthode que nous avons présentée nécessitait 0 cc. 75 d'une dilution au 1/100e d'un sérum hémolytique " marchant " au 1/200e ; l'hémolyse obtenue dans les tubes témoins était aux environs de 130-140.

Mais lorsque nous avons changé notre sérum hémolytique, nous nous sommes aperçu que ce titrage ne suffisait pas pour

définir la dose d'hémolysine à employer dans notre réaction ; ainsi, deux sérums " marchant " d'après le titrage classique au 1/100e, ne donnaient pas, employés à la même dose, la même hémolyse de nos témoins.

Il faut voir là :

— peut-être une action des albumines les unes sur les autres, variable avec les sérums et les compléments, et dans les 2 méthodes dont les principes diffèrent ;

— sans doute aussi une résultante de l'erreur apportée par l'inexactitude du titrage du sérum hémolytique par la méthode classique.

Ce titrage est en effet fonction de la résistance des globules de mouton à l'hémolyse et de la teneur en globules des différents sangs ; variables qui interviennent dans la méthode classique où on cherche l'hémolyse totale pour la lecture, et où la dose de globules employée est pour cela très faible, et n'interviennent pas dans notre méthode où nous employons un gros excès de globules ; — de plus on sait que l'interprétation de la limite exacte d'hémolyse dans le titrage classique est fort délicate.

Il nous a donc semblé nécessaire de définir, à l'aide de la cellule photoélectrique, la dose de sérum hémolytique à employer, avec le complexe même qui nous sert.

Le tableau suivant résume cette manipulation facile : ici il s'agit d'un sérum hémolytique faible :

Dilution du Sérum

à titrer, inactivé, au...	1/4	1/10e	1/20e	1/40e	1/60e	1/80e
— — — —	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Cpl. au 1/5e.....	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
Globules purs.....	1	1	1	1	1	1
Eau physiol.....	qsp. 3 cc	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -

contact 4 heures à 15°C. Complément tel que défini dans nos essais.

Variation de densité optique :

— Avec un 1er mélange de 3 cobayes.	188	197	202	188	173	170
— Avec un 2e mélange	x	x	164 (?)	186	179	170

Dilution du Sérum							
à titrer, inactivé, au...	1/100e	1/120e	1/140e	1/160e	1/180e	1/200e	1/250e
— — — —	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Cpl. au 1/5e.....	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
Globules purs.	1	1	1	1	1	1	1
Eau physiol.	qsp. 3 cc	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -

contact 4 heures à 15°C. Complément tel que défini dans nos essais.

Variation de densité optique :							
— Avec un 1er mélange de 3 cobayes.	164	134	x	81	x	54	x
— Avec un 2e mélange	145	130	115	x	87	63	46

L'hémolyse optima dans les témoins d'hémolyse étant fixée dans notre réaction à 130-140, le sérum hémolytique essayé serait donc à employer à raison de 0.75 par tube de sa dilution au 1/120e ; si on voulait déterminer plus exactement la dilution à employer il suffirait de faire un titrage du S.H. avec des dilutions nombreuses entre 1/100e et 1/140e.

On voit dans ce dosage que l'hémolyse croissante jusqu'à un taux donné en hémolysine semble décroître lorsque cette quantité augmente trop; nous rappellerons que Neisser et Wechsberg *(cf. 41)* ont signalé qu'un grand excès d'ambocepteur neutraliserait le complément qui deviendrait incapable de provoquer l'hémolyse.

*
**

Nous avons parfois remarqué qu'après réaction les tubes témoins des sérums étaient nettement moins hémolysés que les témoins d'hémolyse. Ceci tient à ce que certains sérums humains chauffés ont un " pouvoir empêchant " sur le sérum hémolytique et parfois sur certains sérums de cobayes. Dès lors il nous semble très indiqué d'établir la dose de sérum hémolytique (qui reste la seule variable de notre réaction, variable que l'on fixe une fois pour toutes) à employer, par un titrage en présence de 0 cc. 20 (dose employée dans notre réaction) d'un sérum humain chauffé sûrement négatif, ou mieux, en présence du mélange de plusieurs de ces sérums, ainsi les variations des divers témoins de sérums,

par rapport aux témoins d'hémolyse, sont bien moins grandes que lorsque le titrage du S.H. n'est pas fait en présence de sérums humains. De plus, nous avons remarqué que le pouvoir empêchant l'hémolyse de certains antigènes P. vis à vis de certains compléments de cobayes, disparaît en présence de sérums normaux chauffés, comme si ceux-ci avaient, par leur simple présence, une action de stabilisation.

XI. — CONTRIBUTION A L'ETABLISSEMENT D'UN MICRO-SERODIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS

I. — Micro-Méthode au Sérum frais

Nous avons pensé réduire de moitié les quantités en réaction dans le Rubinstein (méthode à 8 tubes décrite p. 50), ce qui est très possible en se servant de tubes à hémolyse plus étroits, mais il faut encore 0 cc. 40 de sérum humain, ce qui est beaucoup trop.

Nous avons, d'autre part, remarqué que dans le Rubinstein il n'est pas toujours exact de conclure : réaction négative à l'égalité des index hémolytiques dans les deux séries de tubes ; en effet, avec certains sérums très riches en hémolysine anti-mouton, nous voyons tous les tubes hémolysés après 30 minutes à l'étuve à 37°C.

Nous avions pris l'habitude, dans ce cas, plutôt que de multiplier le nombre des tubes en réaction, en « poussant la recherche jusqu'à la limite supérieure du pouvoir hémolytique du sérum au moyen de doses plus élevées d'émulsion globulaire et mesurant l'intensité de la réaction par le degré d'abaissement de cette limite sous l'influence de l'antigène » *(41)* (c'est la méthode de M. Renaud), d'ajouter goutte à goutte des globules dans tous les tubes de la réaction en remettant à l'étuve jusqu'à ce que l'hémolyse ne se fasse plus dans les tubes témoins les plus riches en globules.

Ce procédé économise en effet une grosse quantité de sérum. Il nous fallait parfois ajouter successivement 2-3-4 gouttes de dilution de globules au 1/20e pour atteindre ce but : un décalage d'hémolyse entre les tubes témoins et les tubes de réaction nous donnait alors la valeur syphilitique vraie des sérums examinés, et nous permettait de découvrir parfois des réactions faiblement positives qui, par le Rubinstein classique, risquaient de passer inaperçues.

Nous appuyant sur ces deux remarques, nous avons pensé suivre, sur un seul tube de réaction et un seul tube témoin (ayant au départ la formule, réduite de moitié pour tous ses constituants, des tubes ajoutés à la méthode classique de Rubinstein (p. 50) et qui nous permettent de voir si le sérum possède ou non un pouvoir hémolytique propre, même très faible), le pouvoir anticorps des sérums humains par addition successive de globules en cours de réaction.

Ainsi, la réaction ne nécessite que 0.10 de sérum humain ; son schéma, est, en gouttes, (mesurées avec des pipettes dont 1 cc. égale 20 gouttes) :

	TUBE RÉACTION	TUBE TÉMOIN
Sérum à examiner, non chauffé....	I	I
Antigène Bordet-Ruelens au 1/40e..	III	0
E.P.	0	III
1 heure étuve à 37°C		
Dilution d'Hématies à 2,5 %.....	I	I

Suivre l'hémolyse par addition goutte à goutte d'une dilution d'hématies à 5 % dans l'atmosphère à 37°C.

Le sérum humain est employé autant que possible dans les 24 heures. Les tubes d'hémolyse sont choisis très étroits et en verre fin ; on pourra employer des petits tubes de 5 millimètres seulement de diamètre, comme ceux recommandés pour la réaction de Murata.

Après une heure de contact à l'étuve à 37°C, nous ajoutons une goutte d'une dilution de globules à 2,5 %, nous agitons, et, sans enlever les tubes de l'étuve, nous suivons l'hémolyse dans les tubes témoins et de réactions, ajoutant goutte à goutte une dilution de globules à 5 % sans intervalle de temps entre les diverses additions, dès que l'hémolyse totale du témoin est observée.

Nous arrêtons l'addition de globules quand nous n'avons pas d'hémolyse dans le tube témoin depuis environ 15 minutes.

Nous notons au fur et à mesure les résultats obtenus que nous portons sur un tableau — pour chaque goutte de dilution globulaire ajoutée — en :

— : pour le sérum où il y a la même hémolyse dans le tube témoin que le tube réaction (égalité des titres hémolytiques).

+ : pour le sérum où il y a hémolyse seulement dans le tube témoin.

Pour formuler les résultats, nous servant de la nomenclature indiquée p. 59, nous prenons la moyenne arithmétique des résultats trouvés, soit par exemple :

Sérums	Rubinstein donne	Microméthode donne							Interprétation de la microméthode	Rapport d'hémolyse
		Tube départ	+ 1 gtte	+ 2 gttes	+ 3 gttes	+ 4 gttes	+ 5 gttes	+ 6 gttes		
1	— — —	—	—	—	—	—	—	fin	— — —	0/6
2	— — +	—	—	+	fin				— — +	1/3
3	— — +	—	—	+	+	fin			— ± +	2/4
4	manque cpl	manque cpl			Hémolyse +	+ 1 gtte fin			manque partiel complément, réaction possible au complexe faible, Présomption réaction +	1/1
5	— — —	—	—	—	—	+ ±	fin		— — —	1/6
6	manque cpl	manque cpl							manque total cpl employer complexe fort	0/0
7	+ + +	+	+	+	fin				+ + +	3/3
8	— — +	—	—	+	fin				— — +	1/3

Nous comptions présenter plus longuement nos recherches sur cette microméthode, mais nous nous sommes aperçu qu'une méthode proche avait été présentée en 1917 par d'ESCHBACH et DUHOT *(31)*.

Nous nous faisons un devoir de reproduire l'exposé de cette méthode :

« Le principe de la méthode, dont le second cycle seul diffère des méthodes d'utilisation du sérum non inactivé, est le suivant : une quantité égale de sérum à examiner, soit 0 cc. 1 est disposée dans 3 tubes ; le premier complété par de l'eau physiologique, est le tube témoin ; les deux autres, recevant une dose simple et double d'un antigène anti-syphilitique n'exerçant rigoureusement aucune action anticomplémentaire, sont les tubes de réaction (*) ; séjour à l'étuve à 37° pendant 1 h. 30. A ce moment

(*) (D'après Z. KAMAL *(43)* les tubes sont complétés à 0,30 à l'eau physiologique — les quantités d'antigène sont 0 cc. 1 - 0 cc. 2).

on ajoute dans chacun des 3 tubes, 3 gouttes d'hématies de mouton diluées à 5 %, et on replace à l'étuve en exerçant une surveillance constante. Lorsque l'hémolyse est réalisée dans le tube témoin, deux cas peuvent se présenter :

1°) Pas d'hémolyse dans les tubes de réaction ; le résultat est acquis, il est positif ;

2°) Hémolyse dans les tubes de réaction ; on ajoute de nouveau, dans chacun des 3 tubes, 3 gouttes d'hématies de mouton, puis on replace à l'étuve, sous la même surveillance, et l'on poursuit cette addition de 3 gouttes (ou mieux de 2 ou 1 goutte quand la digestion globulaire se ralentit) chaque fois que l'hémolyse totale du témoin est observée et cela jusqu'à l'une des deux éventualités suivantes : ou bien l'hémolyse continue à être réalisée dans le tube témoin, alors qu'elle ne l'est plus dans les tubes de réaction : le résultat est positif ; ou bien l'hémolyse n'est pas réalisée, ni dans le tube témoin, ni dans les tubes de réaction : le résultat est négatif ».

Demanche *(20)* donne, sous le nom des deux auteurs précités, le schéma suivant d'une réaction modifiée qui se rapproche beaucoup plus de la nôtre et que Eschbach et Duhot ont dû présenter plus tard (nous n'avons pu en trouver la bibliographie) :

Numéros des tubes :	*1*	*2*	*Témoin*
Sérum suspect, frais	1 goutte	1 goutte	1 goutte
Antigène.	1 —	2 —	0 —
Eau physiologique	6 —	5 —	7 —
Etuve à 37° : 1 heure 1/2.			
Emulsion de globules de mouton à 5 %.	1 goutte	1 goutte	1 goutte

Mélanger, porter à l'étuve et surveiller l'apparition de l'hémolyse.

Eschbach et Duhot ont répondu *(32)* aux objections faites contre leur méthode par Rubinstein et Radossavlievitch *(81)*, et un de leurs élèves : Z. Kamal *(43)*, a étudié, étayant son diagnostic sérologique sur leur seule méthode (ce qui peut sembler osé !), la syphilis dans l'asile d'aliénés de Bordeaux.

Il résulte des discussions engagées que les reproches que l'on pourrait faire à notre microméthode seraient :

1°) L'addition de fractions successives de globules : ce procédé diminuerait la sensibilité d'une méthode au sérum frais du fait que les puissances hémolytiques du sérum, et du sérum en présence d'antigène, ne réagiraient pas à l'addition fractionnée de globules aussi complètement qu'à leur addition globale (phénomène de Bordet) ;

2°) La difficulté de se procurer un antigène complètement démuni de pouvoir anticomplémentaire ; un léger pouvoir anticomplémentaire amenant à la limite d'hémolyse un retard dans le tube de réaction, pouvant faire penser à un pouvoir anticorps.

Le premier argument ne semble pas avoir une grosse valeur contre notre méthode.

En effet, à part quelques exceptions, le pouvoir hémolytique des sérums vis à vis des globules n'est pas notablement diminué par l'addition successive au lieu que globale d'hématies, à condition de suivre très exactement et sans retard l'hémolyse dans une atmosphère à 37°C (nous recommandons de ne pas sortir les tubes en réaction de l'étuve) et par addition de globules tiédis.

D'ailleurs, à supposer que les puissances d'hémolyse du sérum soient diminuées par cette addition fractionnée, elles le seraient parallèlement dans les tubes témoins et de réaction, et notre résultat demeurerait sensiblement le même : les puissances d'hémolyse d'un sérum ne diminuent-elles pas d'ailleurs depuis le prélèvement du sang jusqu'à l'examen au laboratoire, et dans des proportions variables avec les sérums et inconnues !

Le gros écueil de notre méthode, comme de celle de Eschbach et Duhot, et de toute méthode procédant par saturation des puissances d'hémolyse du sérum, reste le pouvoir anticomplémentaire de l'antigène.

Eschbach et Duhot *(32)* ont indiqué dans leurs publications « l'importance primordiale de cette absence absolue d'action anticomplémentaire » de l'antigène. Ils indiquent de « titrer chaque antigène en présence d'une série de sérums négatifs avec lesquels la saturation minutieusement poussée à son extrême limite ne doit déceler aucune fixation par rapport au tube témoin » *(31)*.

Ce procédé peut être appliqué pour la recherche du pouvoir anticomplémentaire de l'antigène dans notre méthode. Cependant, il semble qu'un choix des sérums négatifs soit nécessaire car

« M. Renaud, en étudiant les limites inférieures de la réaction de B.W., a constaté que la plupart des sérums humains sont doués d'un certain pouvoir anticomplémentaire spontané... ce pouvoir est surtout développé chez les syphilitiques et il est toujours renforcé par l'addition d'un antigène lipoïdique » *(20)*.

Nous donnerons l'exemple du sérum 1 (cf. tableau p. 135) qui, à la limite d'une puissance hémolytique élevée, n'accuse aucun pouvoir anticomplémentaire et montre que l'antigène employé n'en possède pas.

Cependant, comme pour notre méthode au sérum chauffé, pour cette microméthode au sérum frais, et pour les méthodes au sérum frais en général, se pose le gros problème de la sensibilité de la réaction, atteinte : d'une part, par l'action de l'antigène P. renforçant le pouvoir anticomplémentaire spontané des sérums ; de l'autre, par la " polyvalence " des antigènes P. employés... Il nous semble dès lors nécessaire ici (comme pour la méthode présentée dans ce travail), de ne pas donner dans un examen isolé une valeur sérologique à une réaction très faiblement positive...

Nous avons employé, dans cette microméthode, le même antigène P. que dans nos réactions d'hémolyse : celui de Bordet-Ruelens, préparant la dilution de la même manière, mais au 1/40e : l'antigène très récent n'accusait aucun pouvoir anticomplémentaire. Eschbach et Duhot employaient l'extrait alcoolique de foie de fœtus Hérédo-syphilitique (0 cc. 1 et 0 cc. 2) à la dilution moyenne de 1/120e. Kamal *(43)* dans son travail, dût atteindre la dilution de 1/160e pour obtenir un antigène dépourvu de pouvoir anticomplémentaire.

Nous avons préféré un antigène acétono-alcoolique, Noguchi ayant montré que l'épuisement par l'acétone effectuait une véritable purification, éliminant les substances anticomplémentaires et hémolytiques, et nous avons montré plus haut (p. 123) que l'antigène de Bordet-Ruelens est reconnu, par la plupart des sérologistes, le meilleur de cette série.

En plus du choix de l'antigène, de l'augmentation de la limite de lecture de la réaction par diminution des globules mis en réaction au départ, de la diminution du volume en réaction, de la diminution du nombre des tubes et de la quantité de sérum en réaction, notre méthode diffère de celle de d'Eschbach-Duhot par l'interprétation des résultats.

Nous avons en effet trouvé plus rationnel, au lieu d'attendre pour donner un signe à la réaction un décalage dans l'hémolyse entre les tubes témoins et de réaction, de donner un coefficient dans le diagnostic sérologique à chaque nouvelle addition de globules.

Nous proposons même, au lieu de la notation habituelle, ou jointe à elle, une notation qui renseignera directement sur le pouvoir hémolytique du sérum et sa charge anticorps syphilitique. Pour cela (voir tableau p. 135) nous portons au numérateur le chiffre des additions de globules ayant donné un résultat positif, et au dénominateur le nombre total des additions de globules : évidemment, plus le rapport se rapproche de 1 plus le sérum est positif.

La micro-méthode au sérum frais présentée ci-dessus nous a donné des résultats très proches de ceux du Rubinstein : elle apporte souvent une positivité légèrement plus élevée.

En plus des résultats intéressants d'une méthode dérivée du Hecht, elle nous permet, n'opérant que sur 0 cc 10 de sérum, d'obtenir les renseignements désirés pour le choix du complexe à employer dans notre microméthode au sérum chauffé ; et par comparaison avec les résultats de celle-ci, de nous faire une idée sur la présence possible d'anticorps thermolabiles dans les sérums examinés.

Il est évident que cette méthode nous permettrait d'obtenir un résultat, même dans le cas d'un sérum dénué de puissances hémolytiques propres, ne donnant par conséquent aucune hémolyse des tubes témoins dans la réaction décrite ; il suffirait d'ajouter dans les tubes en réaction, une petite quantité de sérum hémolytique anti-mouton titré ; dans les cas très rares de non apparition de l'hémolyse par ce procédé, accusant un manque de complément naturel du sérum examiné, on rendrait la réaction possible par addition dans chaque tube de 2-3 gouttes d'un sérum humain négatif frais qui apporterait le complément nécessaire.

II. - Micro-Méthode au sérum chauffé.

Cette microméthode est l'application de la méthode que nous avons étudiée dans ce travail.

Le volume total de 3 cc avec lequel nous opérons dans notre réaction a été choisi supérieur au volume nécessaire afin de pouvoir opérer avec plus de facilité. Lorsque le sérum humain fait

défaut, il est facile de réduire de moitié les quantités des réactifs du mélange ; la mesure de la densité optique ne nécessite qu'un cc. de liqueur, qu'il est facile de séparer à la pipette, en opérant en tube étroit et après centrifugation, du 1 cc. 5 en réaction.

Nous avons voulu pousser plus loin cet essai afin d'opérer sur des prises de sang très faibles permettant d'opérer par simple piqûre du doigt.

Nous avons réduit toutes les proportions du mélange au 1/4, et pour opérer avec plus de facilité, avons établi une équivalence approximative en gouttes.

Ainsi, partant d'un S. H. donnant la densité optique désirée des témoins d'hémolyse dans les conditions de l'expérience par dilution au 1/100, nous avons, au lieu d'opérer comme pour la

Macrométhode avec :

	Tube réaction	*Témoin*
E. P.	0.40	0.70
Antigène à 1/10.	0.30	0
Sérum inactivé .	0.20	0.20
Cpl. au 1/5. . . .	0.35	0.35
S. H. au 1/100 .	0.75	0.75
Globules	1 cc	1
Total	3 cc	3 cc

Opéré pour la Microméthode avec :

	Tube réaction	*Témoin*
E. P.	II gouttes	IV
Antigène à 1/13.	II —	0
Sérum inactivé .	I —	I
Cpl. à 1/5,7. . .	II —	II
S. H. à 1/80. . .	III —	III
Globules	V —	V
Total	0.75	0.75

De ce volume total de 0 cc 75, on retire, par centrifugation et pipage, 0 cc. 50 de liquide dont on détermine la densité optique en se servant d'une cuve de 5 millimètres d'épaisseur (capacité 0,50 cc) au lieu de 10 millimètres (1 cc de capacité).

La méthode ainsi exposée ne nécessite donc que 0.10 de sérum inactivé ; elle se fait en tous points comme la méthode présentée et donne les mêmes résultats.

Nous avions espéré faciliter encore cette micromesure par l'emploi du sérum de Ringer... nous avons montré plus haut que ce liquide n'ajoute guère à la sensibilité de la méthode.

Une semblable réaction nous semble devoir être très facilitée par l'emploi d'un système employant le sang humain entier et un système hémolytique antihumain.

*
**

L'intérêt des microméthodes n'est plus à démontrer ; il ne semble pas que l'on s'y soit attaché autant en sérologie qu'en chimie biologique ; elles pourraient cependant y rendre d'immenses services.

Nous rappelons par exemple que KLAUDER et KOLMER *(44)* ont proposé dès 1922 une méthode de diagnostic précoce de la syphilis par la R. de W. sur la sérosité du chancre ; le W. serait positif dans la sérosité du chancre avant de l'être dans le sang et serait parfois positif sur des chancres où l'ultra microscope n'aurait pas décelé de tréponèmes... ; l'intérêt pratique de cette méthode étudiée par MAY *(58)* au point de vue clinique, serait sans doute grand si une microméthode permettait d'éviter une prise difficile de 0,10-0,20 de sérosité...

Nous signalons aussi l'intérêt d'une telle méthode :

Chez les nouveaux-nés : on a souvent noté l'intérêt qu'il y aurait à faire une recherche de la syphilis chez tous les nouveaux-nés, chez qui peut rester latent le virus de la syphilis et qui parfois s'avèrent syphilitiques avec des parents à W. négatifs... et chez qui, de même que chez les bébés que l'on envoie en nourrice, il est difficile de faire une prise de sang importante.

Chez certains malades chez qui la ponction veineuse est très difficile et parfois impossible.

Chez d'autres que les nombreuses prises de sang nécessitées par l'établissement de la courbe sérologique, sans laquelle il n'y a pas de traitement suivi d'une syphilis, impressionnent fortement...

...et toute personne faisant du laboratoire de biologie se rappelle les fréquentes occasions où, pour plusieurs dosages chimiques et Wassermann dans le sang, elle n'a reçu que quelques cc de ce liquide vermeil, alors que dans l'état actuel du diagnostic sérologique de la syphilis, 2 ou 3 méthodes semblent un minimum pour donner un résultat sûr...

Il nous semble donc qu'une microméthode réponde ici aussi à une nécessité que pourrait peut-être remplir un ensemble de méthodes comprenant, auprès des deux méthodes d'hémolyse présentées plus haut, qui nécessitent 0,20 de sérum, 1 ou 2 des méthodes de floculation dont les auteurs ont présenté des microméthodes faciles, ne nécessitant qu'une goutte de sérum : micro-Kahn qui se fait facilement dans des anneaux de paraffine de 13 millimètres de diamètre sur une lame de verre, avec lecture au microscope *(57)*, micro-réaction de Sachs-Witebsky au citochol ; micro-réaction d'opacification (M. M. R.) ou d'éclaircissement de Meinicke qui se font toutes deux à l'aide d'anses de platine calibrées.

Dans ce cas l'ensemble du sérodiagnostic nécessiterait 0 cc 30 de sérum, soit 0,60 à 0,80 de sang que l'on obtiendrait par ventouse scarifiée ou piqûre du doigt.

Nous préférons, au recours à la ventouse scarifiée qui donne une forte hémolyse du sérum, la piqûre du doigt ; « on choisit de préférence le médius de la main gauche, afin de ne pas gêner le malade, et on pique la pulpe du doigt en un point voisin de la racine de l'ongle, région très irriguée » *(84)* en maintenant, pour faciliter l'écoulement du sang, la main du sujet dans une position déclive.

Une forte piqûre à la lancette stérilisée, à l'extrémité de la face palmaire externe du pouce gauche nous a donné aussi de très bons résultats.

Le sang est reçu avec les précautions nécessaires d'aseptie dans un petit tube à hémolyse étroit gradué. On laisse coaguler à la chambre humide. On bouche et centrifuge longuement, on extrait le sérum à l'aide d'une micropipette munie d'une tétine de compte-gouttes.

On prélève 0,10 du sérum pour la microméthode au sérum frais, 0,05 pour le Meinicke (micro). On maintient les petits tubes bouchés pour éviter l'évaporation 30 minutes à 56°, on procède au micro-Kahn et, quand le sérum est refroidi, à notre micro-réaction au sérum chauffé.

XII. — CONCLUSION

Nous avons, dans cette première partie de notre travail, essayé de mettre sur pied une méthode de diagnostic sérologique de la syphilis dérivée du Wassermann, substituant des données numériques aux appréciations qualitatives habituelles.

Cet avantage est donné pour les méthodes de floculation par la méthode de VERNES. Nous avons employé, pour nos essais, un néphélocolorimètre à cellule photoélectrique dont la sensibilité est encore plus grande que celle du photomètre de VERNES, BRICQ et YVON. Tandis que celui-ci compare deux teintes ou deux troubles, laissant jouer l'équation personnelle de l'œil de l'observateur, la cellule photoélectrique permet de lire une graduation, et l'équation personnelle de l'observateur ne joue pas dans cette lecture.

Dans la méthode proposée, nous avons considérablement simplifié les manipulations, afin d'éviter les ajustages compliqués nécessités par les relations exactes qui doivent exister dans le Wassermann type entre les concentrations en globules, en hémolysine et en complément... ajustages qui sont souvent à la base des réactions erronées.

Nous pensons avoir montré la possibilité de suivre, à l'aide de la cellule photo-électrique, la déviation du complément en général, et dans le séro-diagnostic de la syphilis en particulier : d'apprécier ainsi, et en opérant à sensibilité constante, la valeur de l'infection syphilitique, du moins sérologique. Nous avons mené notre travail en confrontant, chaque fois que nous l'avons pu, les résultats du laboratoire avec ceux de la clinique.

Les résultats donnés par notre méthode se sont avérés concorder avec les résultats donnés par les anciennes méthodes pour les sérums négatifs et nettement positifs. Nous n'avons pas toujours obtenu des résultats comparables en utilisant dès sérums qui étaient sérologiquement douteux.

Quoique n'ayant pu nous procurer les signes cliniques et les antécédents exacts de beaucoup des sujets qui ont fourni les sangs étudiés, nous pensons que l'utilisation de notre méthode apporte des avantages importants, parce qu'elle nous permet, par une technique plus rigoureuse et ne laissant aucune part aux sens de l'observateur, de déceler des cas sérologiquement positifs là où les autres méthodes n'ont pas été assez sensibles, ou ont été contradictoires les unes avec les autres.

L'épreuve étudiée nous permet de plus une microméthode de séro-diagnostic précise et simple et un procédé facile d'étude des compléments et des hémolysines dont elle permettra peut-être la standardisation.

La méthode établie, le sujet s'avère cependant loin d'être épuisé.

Seule, une longue étude, établissant les courbes sérologiques (sang et liquide céphalo-rachidien) de nombreux malades, traités par des médications variées, et, confrontant les " signes " de syphilis, ou plus exactement les perturbations sérologiques, révélées par notre méthode, avec les " signes " donnés au médecin par ses examens cliniques, établira la valeur diagnostique exacte de la nouvelle épreuve, susceptible d'ailleurs, comme nous l'avons montré, de nombreux perfectionnements.

XIII. — BIBLIOGRAPHIE

1. M. Andreesco. — Rôle du bicarbonate de soude dans la R. de fixation du complément. *C.R. Soc. Biol.*, 5 juillet 1930.

1 bis. Ch. Auguste. — *Bull. Acad. de Médecine*, 30 octobre 1934.

1 ter. Ch. Auguste. — *Annales I.P.*, T. 56, 1936 - p. 17 - p. 737.

2. B. Ballet et Rubinstein. — *Bull. Soc. fr. de Dermato. et Syphiligr.*, 17 mai 1923, page 259.

3. G. Belgodère. — Réaction de Wassermann. *Monde médical* n° 748 : « Comment lire une analyse », 15 mai 1929, page 609.

4. David Belleli. — *Analyse in. B.I.P.* 1935, page 899.

5. R. Benard et Ed. Joltrain. — Résultats comparés de la méthode de W. et d'une méthode de simplification pratique pour le sérodiagnostic de la syphilis. *C.R. Soc. Biol.*, 1910 (T. II), 30 juillet, p. 241.

6. R. Bernard et Van den Branden. — *Bruxelles médical*, juillet 1936.

7. A.-M. Bonanno. — *Boll. Sez italiana - Soc. Internaz. microb. t. III F.* 10, octobre 1931, page 653.
Analyse in Annales. I. P. 1932, page 282.

8. J. Bordet et G. Ruelens. — L'antigène syphilitique de l'I.P. de Bruxelles. *C.R. Soc. Biol.*, 22 février 1919, p. 880.

9. L. Bory. — Sur le rôle de la cholestérine et des albumines du sérum dans le mécanisme du B. W., *Bull. Soc. Fr. dermato et Syph.*, 8 mai 1932, p. 1.101.

10. L. Bory. — *C.R. Soc. Biol.*, 9 février et 9 mars 1918.

11. L. Bory et B. Guérithault. — Teneur comparée des sérums normaux et syphilitiques en sérine et globuline. *Bull.*

et Mem. de la Soc. médicale des Hôpitaux de Paris, 31 janv. 1919, p. 82-83.

12. H.-G. Brousse. — Thèse Dr pharmacie, *Bordeaux* 1934.

13. Yves Bureau. — La carence sérologique au cours de certaines syphilis secondaires. Thèse médecine, *Paris* 1929.

14. A. Calmette - L. Nègre - A. Boquet. — Manuel technique de microbiologie et sérologie - *Paris - Masson,* 1926.

15. M.-L. Capitan. — Sur l'emploi thérapeutique des liquides de Ringer et de Locke. *C.R. Soc. Biol.* 1906, 3 févr. p. 236.

15 bis. G. Carrière - E. Bertin - Ch. Auguste. — *Annales de Dermato. et Syphil.* 1936, p. 360.

16. M.-L. Chevrel-Bodin et M. Cormier. — Antigènes syphilitiques et mécanisme des réactions sérologiques (réaction de floculation, réaction de fixation) - *Annales de Dermato et de Syphil.* 1933, p. 834.

17. Ch. Craig. — Application pratique de la réaction de W. dans le diagnostic et le contrôle du traitement de la syphilis. *The Am. Journal of syphilis,* janvier 1917.
Analyse in Presse médicale, 22 juillet 1918, p. 382.

18. Ch. Craig et Williams. — *Analyse in Annales de Dermato et Syphil.,* 1923 p. 55.

19. D. Delas et H. Baronet. — Sur la valeur spécifique des réactions de floculation appliquées au diagnostic de la syphilis. *C.R. Soc. Biol.,* 21 décembre 1935 (T. 3, p. 1.191).

20. R. Demanche. — in Traité de la syphilis de Ed. Jeanselme, Tome II, Sérologie, *Paris - Doin* 1931.

21. R. Demanche. — Les récents perfectionnements des réactions de floculation de la syphilis. *Presse médicale,* 5 avril 1933, p. 540.

22. R. Demanche. — Précis de technique du sérodiagnostic de la syphilis. *Paris - Doin* 1936.

23. R. Demanche et Guenot. — A propos de la sensibilité de la méthode de Vernes. *Presse médicale,* 18 juin 1924.

24. A. Desmoulière. — L'antigène dans la réaction de W. *Presse médicale,* 5 novembre 1919, p. 899.
C. R. Académie des Sciences, 1912, p. 592, 927, 1.110, - 27 janvier 1913, p. 338.

25. A. Desmoulière. — *Presse médicale,* 5 novembre 1913, p. 899.

26. M. Doladilhe. — Sur quelques propriétés physiques du sérum sanguin. *C.R. Ac. Sc.* 198, 1934, p. 1.189.

27. M. Doladilhe. — Sur une propriété physique d'un des constituants de la fraction non dialysable d'un sérum sanguin. *C.R. Ac. Sc.,* 7 décembre 1936, p. 1.295.

28. R. Dujarric de la Rivière et N. Kossovitch. *C.R. Sc. Biol.* 4 mai 1935, T. II, p. 42.

29. H. Eagle. — *Analyse in bulletin I.P.,* 1932, p. 584.

30. H. Eschbach et E. Duhot. — Etude comparée du pouvoir hémolytique des sérums humains frais sur les hématies de mouton et de lapin. *C.R. Soc. Biol.,* 8 juin 1918, p. 566.

31. H. Eschbach et E. Duhot. — La saturation du pouvoir hémolytique des sérums frais au cours du séro-diagnostic de la syphilis. *C.R. Soc. Biol.,* 22 décembre 1917, p. 947.

32. H. Eschbach et E. Duhot. — *C.R. Soc. Biol.* T. LXXXII, 10 mai 1919, p. 452.

33. C. Floris. — *Analyse in Bull. I.P.* 1934.

34. Gaucher - Paris - Desmoulière. — Teneur en cholestérine du sérum sanguin des syphilitiques. *Bull. Ac. de Médecine,* Juillet 1912.

35. Gougerot et Ed. Peyre. — Valeur diagnostique de la R. de Desmoulière. *Annales des Maladies vénériennes,* avril 1925, p. 241.

36. M.-M. Grouchauskaïa. — *Sovietsky Vestuik Venerologii i Dermatologii* (Moscou) n° 8 1933, p. 628-631.

37. H. Hansson. — *Analyse in Bull. I.P.* 1932, p. 933.

38. Hilgers. — *Centr. Bakt. Parasitenk I abt.* 89-217-19 (1922)

39. G. Hufschmitt. — Considérations sur la réaction de B. W. *A. Colin Impr. Nancy* 1921.

40. L. Jame - A. Jude. — Variation in vitro de l'alexine de cobaye sous l'influence de certaines conditions météorologiques. *C.R. Soc. Biol.,* 11 juillet 1936.

41. Ed. Jeanselme. — Traité de la syphilis T. II (Sérologie) - *Doin* 1931.
(Nous renvoyons à cet ouvrage très complet pour la bibliographie de la sérologie de la syphilis jusqu'en 1930.)

42. R.-L. Kahn. — La réaction de Kahn, guide pratique. *Baltimore* 1928.

43. Z. Kamal. — Thèse médecine. *Bordeaux* 1918.

44. Klauder et Kolmer. — *Analyse in Annales Dermato et Syphil. T. IV,* janvier 1923.

45. M. W. Kopaczewski. — *C.R. Soc. Biol.,* T. 82, 1919, page 1269.

46. M. W. Kopaczewski. — Mécanisme de la réaction de B. W. *C.R. Ac. des Sc.,* 6 décembre 1920.

47. Ph. Lasseur et L. Spillmann. — Réactions anticorps. Etude quantitative de la fixation de l'alexine. *Fasc. I, Paris - Maloine* 1921.

48. F. Le Chuiton. — Recherche sur la réaction d'opacification de Meinicke. *Presse Médicale,* 26 novembre 1930.

49. M. Leger et G. Martin. — Ce qu'il faut savoir de la méthode syphilimétrique Vernes et des applications du photomètre. *Paris - Maloine* 1929.

50. Leredde et Rubinstein. — *C.R. Soc. Biol.,* 21 mars 1914, T. LXXVI, p. 485.

51. A. Lesure - A. Thomas et J. Lavagne. — Les cellules photoélectriques et leurs applications en chimie biologique. *J. Ph. et Ch.* 1933, p. 1 à 22 - 49 à 61.

52. A. Levy Bing et M. Dogny. — La R. de W. Interprétation des résultats. Causes d'erreurs. *Annales des maladies vénériennes,* octobre 1912, p. 721.

53. R. Lopez-Ruiz. — Etude sur la réaction de Desmoulière. Thèse de Dr en médecine, *Paris* 1933.

54. S. Mangeri. — *Analyse in B.I.P.* 1932, p. 869.

55. L. Massol et V. Grysez. — Sur les variations du pouvoir alexique du sérum frais de cobaye. *C.R. Sc. Biol.* T. LXVIII, p. 588, 9 avril 1910.

56. L. Massol et V. Grysez. — Influence du vieillissement et de la dessication sur la conservation de l'alexine du sérum de cobaye. *C.R. Soc. Biol.,* 14 mai 1910, p. 825.

57. Maupin. — Thèse Dr en médecine, *Lyon* 1934.

58. José May. — La réaction locale de B. W. sur la sérosité des

chancres au point de vue de la clinique ; *Annales de Dermato et Syphil.*, 1924, p. 513.

59. M.-S. Mazza. — *Analyse in Annales de Dermato. et Syphil.*, 1923, p. 58.

60. M. Meersemann. — De la technique et de la valeur comparée des principales méthodes de diagnostic biol. de la syphil. *Archives de médecine et de pharmacie militaires.* T. XCII, p. 365, 1er semestre 1930.

61. J. Montpellier - A. Manceaux. — Pratique hématologique. *Paris, Doin* 1933.

62. L.-F. Morrison. — *Analyse in Chemical Abstracts.* Vol. 16 n° 23, décembre 1922, p. 4.266.

63. S. Mutermilch. — Technique du sérodiagnostic de la syphil. actuellement employée à l'I.P. de Paris. *Annales de l'I.P.*, septembre 1924, T. XXXVIII, p. 826.

64. Née. — Thèse Dr médecine, *Paris* 1934.

65. Nice-Neill et Moore. — *Analyse in Chemical Abstracts.* Vol. 17 n° 11, June 10 1923, p. 1.998.

66. Charles Nicolle. — Pourquoi les méthodes des laboratoires de microbiologie ne peuvent être unifiées. *Presse médicale,* 20 août 1930, p. 1.131.

67. Mladen Païc. — Spectre d'absorption à l'ultra violet des sérums des syphil. *C.R. Ac. Sc.* 1934, T. 198, p. 286.

68. Mladen Païc. — Dispersion rotatoire des sérums de lapins normaux et syphil. *C.R. Ac. Sc.* T. 199, p. 382.

69. Mladen Païc et V. Deutsch. — Examen réfractométrique des sérums normaux et syphil. *C.R. Soc. Biol.*, 12 janvier 1935, T. I, p. 119.

70. Alfred Petterson. — *Analyse in Bull. I.P.* 1932, p. 366.

71. Ed. Peyre. — Intérêt de la méthode des dilutions dans la R. de B. W. (numération des unités d'anticorps). *Presse médicale,* 19 janvier 1921, p. 56.

72. Piccardi et Brunetti. — Observations et expériences de réinfection et superinfection syphil. chez l'homme. *Giornale italiano di Dermatologia e sifilologia,* oct. 1928.

73. Pierret et Breton. — Variations du pouvoir alexique des sérums de lapins gardés à la glacière. *C.R. Soc. Biol.*, 14 décembre 1925 (II), p. 1613.

74. Ranque-Senez et Vayssière. — *C.R. Soc. Biol.* LXXII, 1912, p. 1.105.

75. M. Renaud. — *Soc. médicale des Hôpitaux de Paris,* 28 mars 1924, p. 389 à 407.

76. A.-D. Ronchèse. — La réaction de B. W. *Paris - Masson* 1919.

76. A.-D. Ronchèse. — Conservation du pouvoir complémentaire du sérum de cobaye. *C.R. Soc. Biol.* 1931.

78. A.-D. Ronchèse (note). — « Des causes d'erreurs de la R. de Bordet - Gengou - Wassermann. Interprétation des résultats ».

79. M. Rubinstein. — Emploi des sérums non chauffés pour le sérodiagnostic de la syphil. Technique. *C.R. Soc. Biol.*, 20 janvier 1917.

80. M. Rubinstein. — L'état actuel des méthodes employées pour le sérodiagnostic de la syphilis. *Presse médicale,* 2 fév. 1927, p. 149.

81. M. Rubinstein et Radossavlievitch. — *C.R. Soc. Biol.* 5 avril 1919, p. 361.

82. E.-H. Ruediger. — *Analyse in Chemical Abstracts.* Vol. 16, n° 22, novembre 1922, p. 3.970.

83. Sachs. — *Analyse in Chemical Abstracts* 1922, p. 2.730.

84. A. Sartory et M. Benoist. — La pratique des prélèvements bactériologiques, biologiques, chimiques et industriels. *Paris Le François.*

85. A. et R. Sartory - J. Meyer et Mme Sauter. — Application de la méthode de Hecht au diagnostic de la tuberculose (Importance du facteur complément). *Assoc. Franc. p. Avanc. des Sciences, Nantes* 1935.

86. H. Schmidt. — *Analyse in Bull. I.P.* 1925, p. 211.

87. S. Silbernstein - F. Rappaport et R. Pistiner. — *Analyse in B. I.P.,* 15 octobre 1936.

88. A. Vernes. — Recherches sur la substance spécifique des humeurs syphil. *C.R. Acad. des Sc.,* 12/10/1936, p. 684.

89. A. Vernes. — « Chimie, laboratoire et Prophylaxie ». Conférence à la Maison de la Chimie. *Archives de l'Institut Prophylactique,* T. VIII, n° 4, octobre-déc. 1936. Masson - Paris.

90. H. Vincent. — Sur le déficit alexique du sérum dans le surmenage ou la fatigue aiguë. *C.R., Soc. Biol.,* 13 avril 1918, p. 379.

91. F. Vles. — Précis de chimie physique. *Paris-Vigot,* 1929, p. 355.

92. R.-J. Weissenbach - G. Basch - Martineau. — Nouvelles études sur la R. de Desmoulière. *Annales de Dermato et Syphiligraphie.* 1934, p. 469.

93. Weissenbach et Martineau. — *Bull. Soc. Fr. de Dermato et Syphil.,* 8 mai 1932, p. 1092.

Deuxième Partie

Utilisation de la cellule photo-électrique dans le microdosage des principaux constituants chimiques du sang

---

DEUXIEME PARTIE

UTILISATION DE LA CELLULE PHOTO-ÉLECTRIQUE DANS LE MICRODOSAGE DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS CHIMIQUES DU SANG

PLAN

I. — Introduction

II. — Prise de sang

III. — Microdosage des chlorures

IV. — Microdosage de l'hémoglobine :
  a) Direct ;
  b) Par dosage du fer.

V. — Microdosage du cholestérol total

VI. — Microdosage du glucose

VII. — Microdosage de l'urée

VIII. — Conclusion

IX. — Bibliographie

I. — INTRODUCTION

Considération sur l'analyse chimique médicale et les mesures auxquelles elle donne lieu

— On sait que toute mesure est entachée d'une erreur, résultant d'un certain nombre de causes.

— L'erreur dite systématique est celle qui résulte d'une cause connue. On supprime cette cause ou on effectue une correction pour redresser le résultat.

— Les erreurs dites fortuites sont celles dont les causes sont mal connues ou inconnues. Une mesure n'a de signification que quand les perturbations apportées sont assez faibles, ce qu'on reconnaît par répétition de la mesure qui doit donner des résultats très voisins les uns des autres. Alors on prend la moyenne arithmétique des nombres obtenus et le choix ainsi fait est, par hypothèse, considéré comme la mesure exacte cherchée.

Cette hypothèse n'est valable, bien entendu, que si l'on a effectivement éliminé toute cause d'erreur un peu grave ; par exemple — si effectuant un dosage volumétrique à plusieurs reprises on trouve des résultats différant au maximum de 1/200e d'après la lecture sur la graduation, — la mesure sera fausse cependant si la graduation l'est aussi. Certaines grandeurs sont mesurées par voie indirecte à l'aide d'une formule algébrique. Il est alors nécessaire de calculer aussi l'erreur commise qui résulte des erreurs partielles effectuées dans chaque mesure directe.

Prenons comme exemple la formule d'AMBARD :

$$K = \frac{a \quad s}{\sqrt{\frac{v \quad u \quad 3/2}{t \quad P}}}$$

Sur les mesures de s urée du sang, u urée de l'urine, v volume de l'urine, t durée de la sécrétion, P poids corporel, on commet des erreurs relatives qui peuvent, dans le cas le plus mauvais, accumuler tous leurs effets en donnant sur la constante une erreur relative considérable.

En réalité cela arrive rarement et l'expérimentateur peut s'organiser pour obtenir une compensation partielle des erreurs, de sorte que l'erreur sur la grandeur K ne dépassera pas en général l'erreur la plus importante commise sur une des grandeurs directement déterminées.

Dans le cas actuel, c'est le volume v qui prête aux plus grandes erreurs, comme on le sait.

Cependant, le calcul classique d'erreur fournit la limite maxima de l'erreur commise. Toute variation de la constante observée et supérieure à cette limite maxima correspondra donc à un déplacement réel de la constante.

La nécessité de répéter les mesures dans le temps s'imposera de plus en plus à l'esprit du clinicien, parce que les grandeurs biologiques sont essentiellement variables et que l'on ne connaît la valeur moyenne d'une courbe que quand on a tracé celle-ci et non quand on en connaît un seul point.

Bien des méthodes d'investigations cliniques, consistent, on le sait, à provoquer une perturbation d'un équilibre biologique et à mesurer la variation de l'état d'équilibre qui en résulte. Citons l'épreuve de l'hyperglycémie provoquée, la variation du pH urinaire sous l'influence d'une certaine dose de bicarbonate de soude.

Ou bien encore le clinicien est amené à suivre la vitesse avec laquelle un équilibre rompu par la maladie, revient à son état normal.

Dans tous les cas ce sont des déterminations en série à faire et des courbes à tracer. Cela surtout dans l'examen chimique du sang dont la composition est un reflet des principales fonctions de l'organisme.

Pour que l'analyse chimique soit à la hauteur de la tâche que réclame d'elle le clinicien, il faut donc :

1°) Qu'elle fournisse des résultats entachés d'une erreur moyenne assez faible pour ne pas masquer les variations à étudier;

2°) Qu'elle opère sur des quantités de sang faciles à prélever même d'une manière fréquente - et que les prélèvements soient facilement acceptés par le malade ;

3°) Que l'exécution analytique soit facile pour réduire au minimum toute erreur accidentelle ;

4°) Que le prix de revient de l'analyse soit aussi faible que possible pour pouvoir multiplier les déterminations à mesure des nécessités.

L'intérêt des techniques microchimiques ne peut échapper à personne, « la possibilité de doser les principaux éléments du sang ou des liquides organiques, avec quelques gouttes de ces liquides, est susceptible de faire faire à la clinique elle-même des progrès importants » *(5)*.

Les méthodes microchimiques pour le sang que nous présentons ci-dessous semblent répondre aux multiples desiderata exposés ; elles ont la facilité des méthodes colorimétriques ordinaires et n'en ont pas les inconvénients : car le colorimètre à cellule photoélectrique, dont la sensibilité permet des dosages sur de très petites quantités de solutions chargées d'une matière colorante, ne laisse pas plus d'indétermination dans l'esprit de l'expérimentateur que la lecture d'une graduation sur une burette : l'aptitude de l'œil à juger les couleurs n'intervient en aucune manière.

L'erreur relative commise, donnée par le physicien comme étant de l'ordre de 1-2 %, ne dépasse pas 5 %, et cette marge d'erreur est acceptable pour les besoins actuels de la clinique.

II. — LA PRISE DE SANG

Pour recueillir le sang qui doit être utilisé pour les déterminations microchimiques, point n'est besoin de recourir à la ponction veineuse ; il suffit, après piqûre de l'extrémité d'un doigt à la lancette ou à l'aiguille de Bensaude, de prélever directement le sang nécessaire à la pipette capillaire de précision ; le sang commencera à monter de lui-même par capillarité ; on aspirera au besoin à l'aide de la bouche pour faciliter la montée du liquide visqueux.

On pourra, comme le fait DURUPT, « frotter légèrement la peau avec un peu de xylol qui facilitera l'hyperhémie de la région et l'écoulement consécutif du sang » *(5)*.

Nous nous sommes servi de pipettes capillaires de 0 cc. 1, 0 cc. 2 ou 0 cc. 3 préalablement calibrées. Ces pipettes doivent être nettoyées au mélange chromique chaud. Il est bon de ne les sortir du mélange chromique qu'au moment du besoin, de les laver alors à l'eau distillée, à l'alcool, à l'éther, et de les faire sécher en faisant passer un courant d'air.

Lorsqu'on n'usera que du sérum, il suffira de centrifuger le sang ainsi recueilli dans des tubes à hémolyse très étroits dès coagulation.

Au lieu de prélever le sang directement à la pipette, il est beaucoup plus expédient de le recevoir par écoulement après la piqûre, dans un tube à hémolyse gradué par exemple à 0,30 ou 0,50 : on recueille le sang par écoulement, on laisse coaguler, et l'on recueille le sérum après centrifugation. Si on opère sur le sang entier ou le plasma, on recueille le sang dans un tube à hémolyse gradué ayant subi la préparation suivante :

On introduit dans le tube 0 cc. 2 d'une solution contenant 2 gr. 50 d'oxalate neutre de Na dans 100 cc. d'eau (cette solution est de mauvaise conservation et peut être rapidement envahie par

les moisissures ; pour éviter cet accident on peut, soit la stériliser à 100°C, soit ajouter un antiseptique ne gênant pas le dosage à effectuer). Ainsi, par exemple : pour le dosage de l'hémoglobine nous avons employé la solution d'oxalate précitée contenant 50 mlligrammes de $Hg\ Cy^2$ pour 100 cc., qui ne gène en rien le dosage.

La solution étant étalée sur les parois du tube, on évapore l'eau par un courant d'air chaud passant dans le tube, et quand celui-ci est sec on le bouche avec un liège paraffiné. De semblables tubes peuvent être répartis dans les services pour servir au moment du besoin : on reçoit le sang, on roule le tube dont les parois sont tapissées d'oxalate de Na, en position verticale entre les mains pour assurer la dissolution de l'oxalate dans le sang, et cela suffit à empêcher la coagulation de 2 cc. de sang.

N. B. — Si on doit renouveler à courts intervalles des petites prises de sang, on préviendra la coagulation en plaçant sur la piqûre très peu de la solution d'oxalate formulée plus haut.

III. — MICRODOSAGE DES CHLORURES

DETERMINATION DE LA CHLOREMIE :

L'usage s'est établi de désigner sous le nom de chlorémie, la concentration du sang en chlorures totaux. On l'a exprimée pendant longtemps en grs de Na Cl, mais l'usage s'établit de plus en plus de l'exprimer en grs de Cl' à l'état d'ion chlorure et en France on rapporte généralement cette quantité au litre, soit de sang entier, soit de plasma, soit de purée globulaire obtenue par centrifugation. A l'étranger, on donne souvent la concentration en poids rapportée à 100 grs de substance analysée. Il est du reste facile de passer des concentrations en volumes, et des concentrations en poids, en utilisant la densité du liquide analysé.

N. B. — Chez l'homme sain la densité du sang entier varie entre 1.054 et 1.062 ; chez la femme, entre 1.050 et 1.056. Dans les états pathologiques, les variations sont de 1.030 à 1.080. On peut donc admettre une moyenne de 1.058.

CHLOREMIE DANS LES ETATS PATHOLOGIQUES :

Ce sont les travaux des cliniciens français : Chauffard, Widal, Ambard, Achard, Marcel Labbe, Rathery, Loper, Blum, Castaigne, Fiessinger, Merklen et de leurs élèves qui ont éclairci le difficile problème de la traversée de l'ion Cl' dans l'organisme malade.

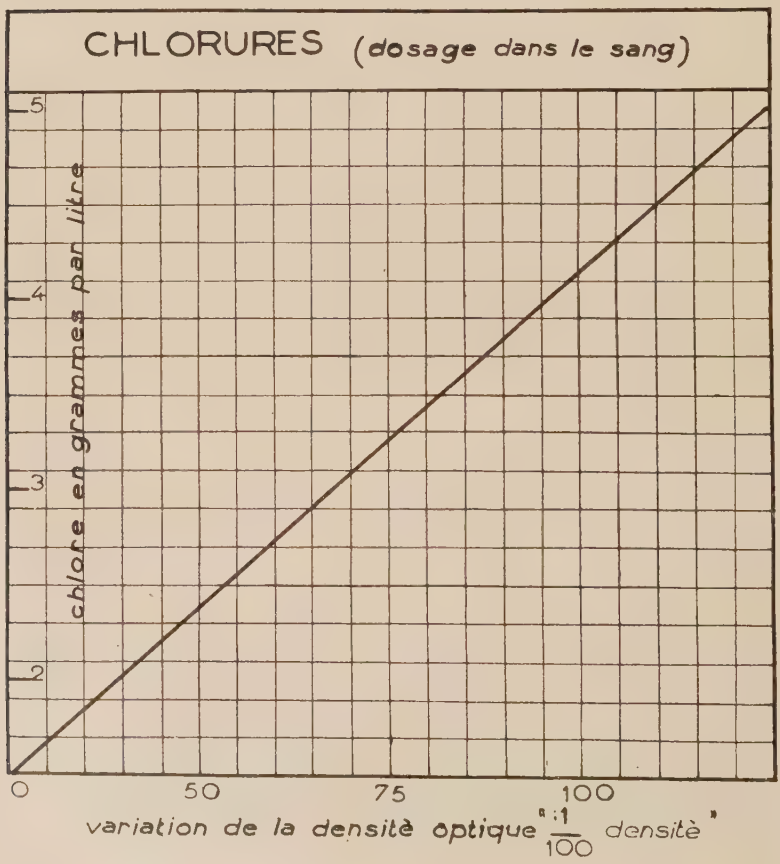
On sait actuellement que cet organisme est capable d'accumuler dans ses tissus des quantités importantes de chlorures puis, au contraire, de subir par les voies urinaires et gastro-intestinales des pertes également importantes sans que la chlorémie en soit grandement perturbée. Néanmoins, depuis ces travaux, les déterminations des chlorémies plasmatiques ou globulaires sont devenues pour le clinicien des informations indispensables.

Les néphrites chroniques intersticielles avec grande azotémie amènent facilement des rétentions sèches dans lesquelles la chlorémie plasmatique peut atteindre le chiffre de 4 gr. 80 de Cl par litre.

Dans les néphrites hydropigènes sans acidose, la déchloruration systématique de l'organisme doit être suivie pour ne pas amener d'hypochlorémie plasmatique exagérée, capable de provoquer des azotémies dangereuses. Le chiffre de la chlorémie ne doit pas devenir inférieur à 3 grs de Cl par litre de plasma.

MICRODOSAGE DES CHLORURES DANS LE SANG :

La cellule photoélectrique nous a permis d'établir une méthode de dosage particulièrement simple, rapide, tout en étant



suffisamment exacte et opérant sur des quantités très petites de sang.

Technique :

Prélever, par piqûre du doigt, avec une pipette graduée au 1/1000 cc., 0 cc. 2 de sang (*). Mélanger et laver la pipette dans 1 cc. d'une solution nitrique de NO^3 Ag N/10 contenue dans un tube à hémolyse. Porter au B.M. bouillant 1/4 d'heure. Centrifuger, décanter. Laver 3 fois le précipité avec de l'eau acidulée par NO^3 H.

Après lavage, dissoudre le chlorure d'argent dans 1 cc. environ d'ammoniaque. Introduire cette solution et les eaux de lavage dans une jauge de 25 cc. - Ajouter environ 15 cc. de glycérine pure. Agiter. Ajouter à nouveau 0 cc. 5 de sulfure d'ammonium, agiter et compléter à 25 cc. avec de la glycérine.

Mesurer la densité optique à la cellule en employant l'écran bleu.

La droite ci-jointe donne directement la concentration en ion Cl' en gramme par litre, en fonction de cette densité exprimée en 1/100e de densité.

Il faut, avant de mesurer la densité optique, bien éliminer les bulles d'air de la solution glycérinée.

Expression des résultats :

La partie utile de la courbe peut être assimilée à la fonction :

$$[Cl'] = \varphi(\Delta) \qquad \Delta = (\text{variation de la densité optique d exprimée en } \frac{1}{100} \text{ d'unités})$$

de l'ordre de : $y = ax$

où $a = \frac{y}{x}$

(*) Laudat a signalé que dans la détermination du rapport chloré érythro-plasmatique il faut avoir soin, pour ne pas introduire des causes d'erreurs dans le dosage, que la concentration en oxalate du sang oxalaté ne soit pas supérieure à 1 %. (*Bull. Soc. Chimie Bio.*, mars 1937, tome XIX, n° 3).

Or, les concentrations extrêmes sont ici pour :

x = variation de la densité optique = (Δ) : 25 à 125 ;

y = concentration en Cl' en grs. par litre : 1,5 à 5.

$$\text{Dès lors } a = \frac{y - yo}{x - xo} = \frac{5 - 1,5}{125 - 25} = 0,035$$

$$y - yo = a\,(x - xo)$$

$$y - 1,5 = 0,035\,(x - 25)$$

$$y = 1,5 + 0,035\,x - 0,875$$

$$y = 0,625 + 0,035\,x$$

Et on a, à partir de 0 cc. 20 de sang :

[Cl' en gr. par litre] = 0,625 + 0,035 x.

IV. — MICRODOSAGE DE L'HEMOGLOBINE

DOSAGE DIRECT DE L'HEMOGLOBINE :

Par piqûre du doigt et avec une pipette de 1/10e de cc. graduée au 1/1.000e de cc., nous prélevons 50 mmc. de sang que nous recevons dans 1 cc. 950 d'eau distillée placée dans un tube à hémolyse. Par mélange et lavage de la pipette avec cette eau distillée, le sang s'hémolyse rapidement, donnant une solution fortement colorée.

On introduit 1 cc. de celle-ci dans la cuve à face parallèle ayant cette même capacité et qui sert à équiper le colorimètre.

La variation de la densité optique due à la matière colorante est mesurée en employant l'écran bleu, et à l'aide du graphique donné (*droite I*) on détermine rapidement le nombre de grs d'hémoglobine contenu par litre de sang en fonction de la variation de la densité optique observée.

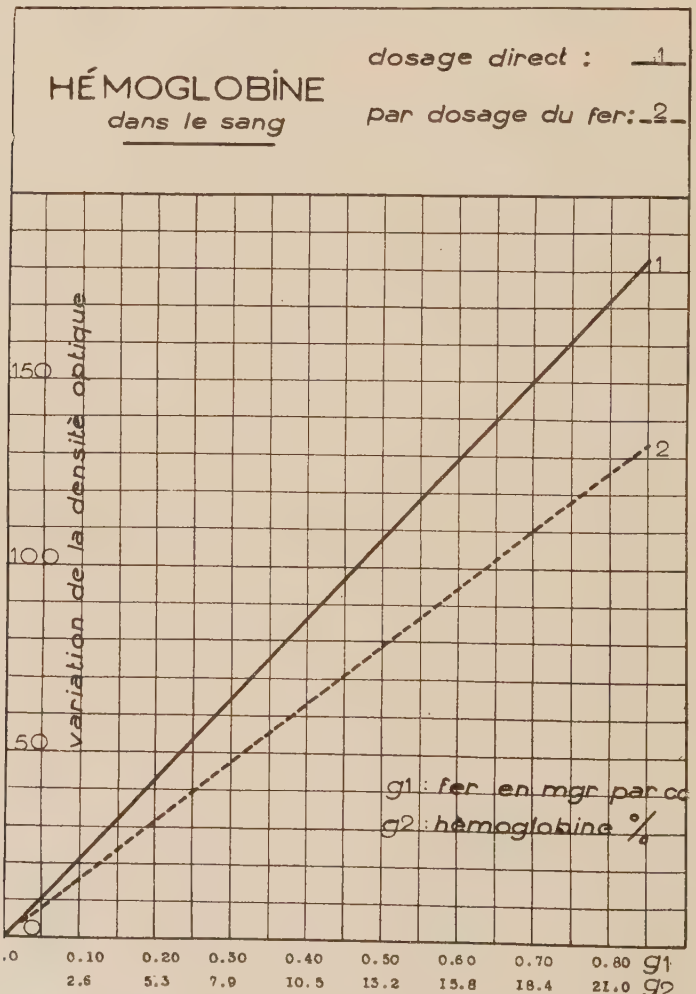
La courbe obtenue doit être tracée pour chaque appareil, c'est là une chose facilè pour peu qu'on parte d'une suspension d'hématies de titre connu en hémoglobine, et en effectuant les dilutions nécessaires pour lesquelles on peut employer l'eau distillée.

La suspension d'hématie est préparée à partir d'un sang de bœuf défibriné et centrifugé ; nous y dosons l'hémoglobine par la méthode idométrique de MM. Lasausse et Frocrain *(12)* dont nous rappelons la technique :

« On introduit dans une capsule de porcelaine à fond plat, 5 cc. d'un sang préalablement laqué par addition de 1/10e de son volume d'ammoniaque officinale. On ajoute 1 cc. d'un lait de magnésie contenant 10 grammes de magnésie (calculée anhydre) dans 100 cc. de suspension.

On délaie avec un fil de platine, on évapore et charbonne à basse température à l'abri des poussières ferrugineuses. On incinère au moufle. Le contenu de la capsule est repris par 0 cc. 5 d'acide chlorhydrique exempt de fer. On évapore à sec au bain-marie et on reprend à nouveau par 0 cc. 5 d'acide chlorhydrique.

Ces évaporations ont pour but d'éliminer toute trace possible d'acide nitrique. On ajoute alors 5 cc. d'eau. Tout se dissout. On



Le graphique donne directement la teneur en fer (en mgr. par cc) et en hémoglobine %, en fonction de la densité optique ($\frac{1}{100}$ de densité).

Si la teneur en fer dépasse 0,85 mgr. par cc, faire une dilution plus forte ou employer la cuve de 5 mm. d'épaisseur.

décante dans un petit vase de 100 cc. à précipitations chaudes en verre Pyrex.

La capsule est rincée par fractions avec 10 cc. d'une solution d'iodure de potassium à 10 %, qui rejoignent la solution acide. Au bout de 3 minutes, temps de réaction destiné à libérer l'iode (d'après l'équation $Fe^{\cdots} + I \rightleftharpoons Fe^{\cdot\cdot} + I$) on dose cette iode par l'hyposulfite N/200 dont 1 cc. correspond à 0,279 mg. de fer. Un titrage à blanc permet d'éviter les erreurs dues aux impuretés des réactifs.

Le dosage se fait à la microburette, en présence de 3 gouttes d'empois d'amidon à 1 pour 100. Le chiffre obtenu est multiplié par 1,1 pour tenir compte de la dilution du sang par l'ammoniaque.

5 cc. de sang normal renfermant environ 2 mg. 5 de fer, nécessitent par conséquent environ 10 cc. d'hyposulfite 0,005 N pour obtenir le virage. La solution d'hyposulfite est titrée à l'aide d'une solution de sulfate ferrique, de titre équivalant en fer ».

On constate sur le graphique ci-joint que si la teneur en hémoglobine ne dépasse pas 22,4 mgr. par cc. d'échantillon à analyser, la courbe représentative est une droite.

Si cette teneur est dépassée, on dilue la solution à essayer pour se mettre dans les conditions convenables ; ou on emploie la cuve de 0 cm. 5 d'épaisseur.

On sait que l'hémoglobine, au contact de l'air, se sature très rapidement d'oxygène et que l'équilibre final est atteint presque instantanément.

L'expérience nous a montré que dans la série des mesures l'écart de chaque point avec la droite tracée, est en général très faible et ne dépasse pas 5 %. Cette méthode de dosage, sous forme d'oxyhémoglobine est de beaucoup la plus simple et on peut obtenir le résultat en 3 minutes, y compris le temps employé à la prise de sang. Mais dans quelques cas, si le sang renferme des pigments biliaires, le dosage aboutit à des chiffres entachés d'inexactitudes et il est alors nécessaire de détruire la matière organique et de ramener le dosage de l'hémoglobine à un dosage colorimétrique du fer.

DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE PAR DOSAGE COLORIMETRIQUE DU FER :

La technique est alors modifiée de la façon suivante :

La prise de sang de 0 cc. 05 est introduite dans une capsule de porcelaine contenant déjà 0 cc. 10 de nitrate de magnésie à 50 % — on lave la pipette avec un peu d'eau et on envoie l'eau de lavage dans la capsule.

On sèche à 100° et on incinère à l'abri des poussières en utilisant un brûleur en laiton.

Le résidu est repris par 0 cc. 5 d'HCl pur, exempt de fer, additionné de 1 cc. 5 d'eau bidistillée.

On ajoute, après dissolution du fer, 1 cc. de sulfocyanate d'Am à 50 %.

Tous ces volumes doivent être exactement mesurés avec des pipettes bien calibrées de façon à faire un volume total de 3 cc. La coloration atteint son maximum presque instantanément, et il suffit d'introduire dans la cuve de 1 cc. du colorimètre à cellule photoélectrique une partie de cette solution colorée qu'on examine sous une épaisseur de 1 centimètre avec l'écran bleu et de mesurer la variation de la densité optique.

On remarque que cette variation est sensiblement proportionnelle à la quantité de fer et par conséquent d'hémoglobine contenue dans la prise d'essai dans les conditions opératoires décrites.

La correspondance entre la teneur en hémoglobne et la variation de densité optique pourra être représentée par une droite comme dans le graphique indiqué plus haut, mais la droite sera distincte de la précédente (*droite II*).

Dans les conditions opératoires décrites, cette droite aura une pente un peu plus faible, c'est-à-dire sera située au-dessous de la première.

INTERET D'UN MICRODOSAGE DE L'HEMOGLOBINE :

L'intérêt d'un microdosage facile, rapide et cependant exact de l'hémoglobine, apparaît d'autant plus grand que des travaux récents de W.-L. Dulière et M. Adant *(4)* semblent démontrer

que : le volume globulaire, la concentration en fer ou en hémoglobine et la capacité de fixer l'oxygène d'un sang, sont des quantités liées entre elles par une relation linéaire du premier degré, autrement dit, il est possible, d'après ces auteurs, quand on a déterminé expérimentalement l'une de ces quantités, de calculer les 3 autres. Les auteurs ont dressé un graphique qui facilite ce calcul.

Ces grandeurs définissent l'activité d'un sang comme vecteur d'oxygène et d'une manière plus efficace que ne peut le faire la numération des globules rouges que l'on pratique habituellement. Des travaux précédents, il résulte en effet que la concentration de l'hémoglobine, et par conséquent du fer dans un globule rouge, varie dans des limites étroites. Il ne faut pas confondre cette concentration avec la valeur globulaire, grandeur proportionnelle à la charge totale d'un globule rouge en hémoglobine (ou en fer). - Ainsi on est amené à penser que la variation de la valeur globulaire d'un sang a sa cause essentielle dans les variations correspondantes du volume globulaire moyen.

Il nous a semblé utile de joindre le dosage ci-dessus exposé à notre travail. Il nous permet de connaître les conditions d'hémolyse que nous devons exiger dans le séro-diagnostic que nous présentons dans la première partie de ce travail. Il ne nous est en effet pas permis de sortir dans cette manipulation, tant pour nos tubes de réactions que nos tubes témoins du complément et de l'hémolysine, de la zone où la représentation des densités optiques de solutions croissantes en hémoglobine cesse d'être une droite, sans introduire dans nos résultats une cause d'erreur.

Il est nécessaire afin d'éviter des erreurs de ne jamais se servir des points extrêmes des courbes donnant la densité optique en fonction des résistances que les plots auxquels elles correspondent introduisent dans le circuit — (cette remarque doit être respectée dans tous les microdosages présentés).

Le graphique donnant le taux en hémoglobine d'un sang hémolysé en fonction de la densité optique permettrait, à ceux qui ne possèdent pas de cellule photoélectrique et qui désireraient essayer le séro-diagnostic ci-dessus exposé, de monter l'essai en dosant l'hémoglobine libérée dans l'hémolyse par une méthode

colorimétrique. Il leur permet en effet de partir de témoins d'hémolyse identiques à ceux que nous définissons par leur densité optique, en déterminant ces témoins par les charges en hémoglobine mises en liberté dans l'hémolyse correspondant aux densités optiques proposées.

V. — MICRODOSAGE DU CHOLESTEROL TOTAL

Un microdosage du cholestérol dans le sang a été déjà décrit par G. Etienne et Verain *(6)* (à l'aide du photomètre de Vernes en opérant sur 0,5 *(16)* de sérum et en utilisant la réaction classique de Liebermann). - Laurent - Gérard *(15)* en a aussi réalisé un dosage colorimétrique à l'aide de cet appareil en opérant en lumière monochromatique.

Mais 0,50 cc. est déjà une quantité importante de sérum. L'établissement d'une véritable micro-méthode de dosage du cholestérol dans le sang est rendu délicat du fait des grandes variations du cholestérol à l'état pathologique, mais par ce fait même le dosage peut supporter une exactitude plus faible que celle nécessitée pour le dosage des autres constituants du sang, d'autant plus qu'en dehors de toute atteinte pathologique le cholestérol subit dans le sang de fortes variations (facteurs individuels, digestion, régime alimentaire, état gravidique et puerpéral)...

Nous n'avons cherché à réaliser que le dosage du cholestérol total : le sérum normal contient, on le sait, en moyenne 1 gr. 50 à 2 grs. de cholestérol total, mais ce taux s'abaisse vers 0,10 à 0,50 dans les infections graves, alors que dans le brightisme et surtout dans les ictères par rétention il y a augmentation considérable dépassant 8 grs. par litre *(7)*.

Si l'on veut opérer le dosage sur 0,1 cc. de sérum humain, il faut donc pouvoir doser de 1/100e à 1 milligramme de cholestérol.

Partant de ces données, nous avons cherché à établir des gammes colorées telles que l'on puisse doser à la cellule avec une exactitude suffisante, les quantités de cholestérol précitées.

Des réactions colorées du cholestérol, la réaction de Liebermann est celle qui se prête le mieux à ce dosage ; c'est à elle que nous nous sommes arrêté.

Nous avions pensé remplacer comme solvant du cholestérol le chloroforme dont le point d'ébullition est assez bas (61°) par un produit bouillant à une température plus élevée, ainsi l'acide acétique employé par SCHOENHEIM et SPIRAY *(21)* dans leur microdosage (0 cc. 2 de sérum) colorimétrique sur le précipité de digitonine-cholestérol, mais la solubilité du cholestérol n'y est pas très grande ; de même le xylol, le tétrachlorure de carbone, le toluène, ne donnent pas une coloration aussi intense et aussi rapide que le $CHCl^3$. Dès lors, nous nous sommes arrêté à ce solvant qu'il est nécessaire d'employer bien sec, et, afin d'éviter les pertes par évaporation, nous avons opéré à une température ne dépassant pas 15°C et en tubes bouchés. Il est évident que, ne disposant que d'une cuve de 1 centimètre d'épaisseur il y aurait, dans une évaporation, même légère, une cause d'erreur. Le dosage pourrait être amélioré considérablement à ce point de vue en diluant, dans des proportions beaucoup plus fortes, la solution chloroformique de cholestérol, et en employant une cuve d'une longueur proportionnelle à ces dilutions.

Dans le dosage de la cholestérine totale, il est de toute nécessité d'avoir une saponification bien complète des éthers du cholestérol qui accompagnent dans le sang le cholestérol libre, si on veut réaliser un dosage exact : cette saponification est difficile et nécessite des méthodes énergiques.

L'épuisement par la méthode classique de A. GRIGAUT peut servir, et il nous a donné de bons résultats en versant successivement, et dans l'ordre, dans une ampoule à décantation de 10 cc.

0.1 cc. de sérum humain ;
3 cc. d'alcool à 60° sodé à 0.5 % ;
4 cc. d'éther ;
1 goutte de teinture de cochenille.

On mélange à chaque addition — laisse reposer 10 minutes. Soutire la couche inférieure colorée que l'on remplace par 4 cc. d'eau distillée et 1 goutte de teinture de cochenille en coulant le long des parois. On recueille l'éther d'épuisement et de lavage.

La solution éthérée est évaporée au B.M. à sec et on fait la réaction colorée.

Cependant, nous avons préféré nous inspirer du procédé opératoire d'épuisement de Mühlbock et Kaufmann présenté par MERCK *(18)* dans ses Techniques de chimie médicale et qui semble plus rationnel.

Voici la technique que nous proposons :

EXTRACTION : dans 10 cc. d'un mélange d'alcool et d'éther (3 parties d'alcool pour 1 partie d'éther) on laisse tomber goutte à goutte 0.10 cc. de sérum. On laisse reposer 30 minutes, filtre la solution, rince le filtre soigneusement à l'alcool éther. Le filtrat évaporé à siccité au B.M. laisse un résidu, qui est repris plusieurs fois par l'acétone (15 à 20 cc.). On évapore à sec l'extrait acétonique, dissoud le résidu dans 10 cc. d'alcool éthylique, ajoute 0.1 cc. de lessive de soude concentrée et chauffe au B.M. jusqu'à concentration à 1 cc. - On ajoute sans délai 0.5 cc. d'une solution moléculaire (3/1 normale) d'acide phosphorique (vérifier au tournesol que le milieu est devenu acide) et 15 cc. environ d'éther de pétrole (O. KAUNER et M. CHANGOGNE *(10-11)* ont montré que ce solvant entraîne tout le cholestérol libre), on agite vigoureusement, chauffe à ébullition et décante l'éther de pétrole sur un petit filtre. On répète la décantation 4 à 5 fois et évapore l'éther de pétrole dans une toute petite capsule.

REACTION COLOREE :

Le cholestérol total de 0,1 de sérum se trouve donc dans la capsule. On y verse 1 cc. 75 du mélange suivant : préparé extemporanément :

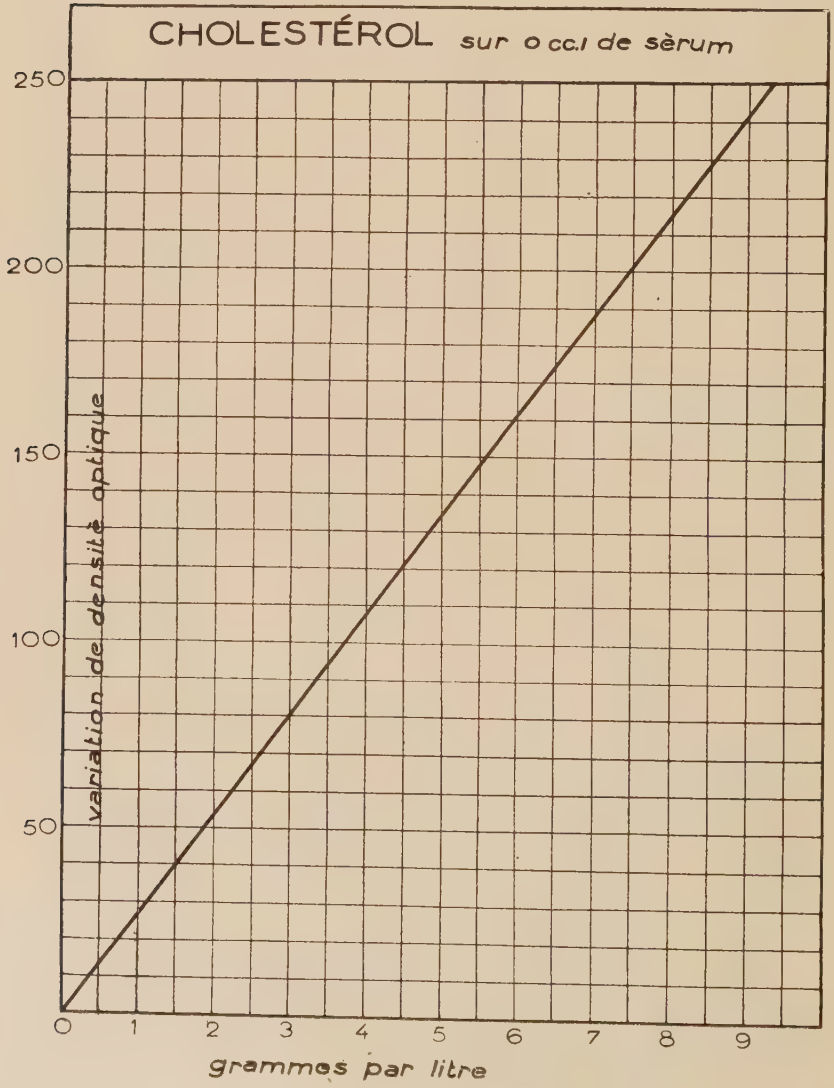
Chloroforme séché sur Ca Cl_2 fondu. .	12	cc.
Anhydride acétique	5	cc.
Acide sulfurique.	0,5	cc.

On agite pour solubiliser entièrement le cholestérol dans ce liquide et on introduit dans de petits tubes à hémolyse numérotés que l'on bouche au liège. On agite, porte à l'obscurité *(7)* ; au bout de 30 minutes, on détermine la densité optique du mélange en expérience. Un tube témoin peut être fait avec une solution titrée de cholestérine pure (avec 0 cc. 1 ou 0 cc. 2 par exemple d'une solution à 1 gramme par litre) et joint à chaque série de dosages ; c'est là une vérification de la bonne marche du colorimètre. On mesure la densité optique du liquide servant à la coloration et celle du tube coloré : la différence donne la densité optique vraie du liquide examiné.

Nous faisons la mesure des densités optiques après 30 minutes de réaction, la teinte est alors maxima. Cette teinte étant le vert, nous employons un écran rouge ; nous avons choisi l'écran Pyrex n° 348 (H.R. Red shade Yellow).

Le graphique ci-joint donne directement en grammes par litre de sérum la quantité de cholestérol, le dosage étant fait sur 0.10 cc. de sérum.

Ce graphique a été établi à l'aide de densités optiques données par 4 solutions titrées différentes de cholestérol pur, à



l'aide de 15 tubes témoins s'échelonnant à des doses correspondant à une concentration en cholestérol de 0 gr. 10 à 10 gr. par litre de sérum, et après calcul de leurs représentations graphiques par la méthode des moindres carrés.

L'exactitude de la méthode ne devient suffisante qu'à partir de 0 gr. 30 à 0 gr. 40 de cholestérol par litre de sérum : taux très rarement atteint ; pour des doses inférieures il suffirait d'opérer le dosage avec une quantité double de sérum. A partir d'une concentration de 8-9 gr. par litre, il faut avoir recours à la cuve de 5 m/m d'épaisseur.

La courbe donnée peut servir évidemment au dosage du cholestérol, quelle que soit la méthode d'épuisement employée, pourvu que le solvant final soit le même.

N. B. — Le dosage du cholestérol se fait, selon les auteurs, sur le sérum, le plasma ou le sang entier oxalaté.

On peut évidemment opérer le dosage présenté sur le sang oxalaté : on sait cependant que « uniformément réparti entre les globules et le plasma à l'état normal, le cholestérol s'accroît presque uniquement dans le plasma à l'état pathologique ; c'est dire que, seules les variations de la cholestérolémie plasmatique sont intéressantes » *(2)*.

Il semble nécessaire, dès lors, de bien noter le produit sur lequel on a fait le dosage, d'autant plus que KAUNER *(11)* a montré que le sérum contient généralement plus de cholestérol que de plasma.

VI. — MICRODOSAGE DU GLUCOSE

MM. Ed. Lasausse et L. Frocrain *(13)* qui avaient, en janvier 1936, montré tout l'intérêt pratique du « dosage colorimétrique du Cu par la méthode de M. Délépine dans les produits d'origine biologique » ont, avec M. R. Kermarec, fait connaître tout récemment une micro-méthode de « dosage du glucose dans le sang par colorimétrie du cuivre » *(14)*.

Cette méthode permettant de se contenter d'une prise d'essai de 0,2 cc. de sang étant d'exécution facile, nous avons été amené à chercher s'il ne serait pas possible, pour la simplifier encore et lui donner une précision plus grande, d'effectuer le dosage au moyen de la cellule photoélectrique.

Nous avons réussi cette adaptation, mais nous avons été amené à modifier pour cela certains points de la technique.

En effet, comme il nous faut opérer sur des solutions beaucoup plus concentrées pour développer la coloration utilisée au dosage, la dissolution de l'oxydule dans l'eau régale ne peut plus être entreprise car elle amènerait consécutivement une précipitation de la matière colorante ; nous nous sommes alors aperçu qu'il était tout aussi simple de dissoudre l'oxydule dans l'ammoniaque par agitation à l'air, la dissolution est complète, et, dans les conditions qui ont été décrites, la coloration développée sous l'influence du diéthyldithio-carbamate de soude est extrêmement stable et se prête très bien au dosage.

PREPARATION EXTEMPORANEE DU REACTIF COLORANT :

On mesure ce qui correspond à 1 gr. de sulfure de carbone (environ 0 cc. 77), on ajoute 10 cc. de solution alcoolique à 10 % de diéthylamine (conservée à l'obscurité) - agite - ajoute 7 cc. de soude 2 N, il se forme un précipité - on agite et complète à 140 cc.

avec de l'eau distillée. La solution obtenue ne doit être que très légèrement colorée. On en emploie 10 cc. par dosage.

ETABLISSEMENT DE LA METHODE :

Dans la technique utilisant la cellule photoélectrique, comme dans les méthodes de dosage volumétrique du reste, il y a des conditions optima de concentration qui réalisent le maximum de précision et de sensibilité. Ce sont ces conditions qu'il faut préciser de façon à mettre en œuvre une solution qui ne soit ni trop concentrée, ni trop diluée. Les essais que nous avons faits pour mettre cette méthode au point nous ont montré que la courbe représentative du phénomène (c'est-à-dire la variation de la densité optique sous l'influence de la variation de concentration) peut être assimilée à une droite, le dosage étant fait, après défécation de 0.2 cc de sang, sur 1 cc de liquide clair qui correspond à 0.1 de sang, si le taux en glucose ne dépasse pas 2 grs., 2 grs. 25 par litre.

Nous avons établi la représentation de cette droite en nous servant de la méthode des moindres carrés.

Or les concentrations normales extrêmes du glucose dans le sang ne s'écartent pas de 0 gr. 80 à 1 gr. 20 par litre. Les états d'hypoglycémie <0 gr. 80 peuvent être intéressants à étudier mais les résultats obtenus jusqu'ici ne permettent pas d'en tirer des conclusions cliniques intéressantes. L'hyperglycémie peut atteindre dans le diabète vrai 1 gr. 50 à 2 gr. ou 3 gr. pour 1.000 ; elle dépasse rarement ce chiffre.

Les doses les plus souvent observées vont donc de 0 gr. 80 à 2 grs.-2 grs. 25 — le graphique ci-joint nous permet de les lire rapidement. Au-dessus du taux de 2 grammes par litre, il suffira de diluer le liquide coloré de moitié. Il faudra alors avoir bien soin de ne pas diminuer la concentration du mélange en ammoniaque (20 cc au moins pour 50 cc de mélange), ni en réactif colorant (20 cc de la solution de diéthyl-dithio carbamate de soude pour 50 cc de mélange). On fera la mesure dans les conditions ordinaires et on multipliera le taux de glucose trouvé par 2.

DETAILS OPERATOIRES :

Messieurs Lasausse et Frocrain s'étant aperçus qu'il était préférable comme liqueur de Fehling d'utiliser, non pas la formule

qu'ils avaient d'abord donnée *(14)* mais celle qui a été proposée par Fontes et Thivolle, car elle donne une auto-réduction beaucoup moins importante que la première, nous avons employé cette formule *(3)*.

Pour la technique opératoire, on travaille au début conformément à la description déjà donnée par MM. Lasausse, Kermarec et Frocrain *(14)* et que nous rappelons, sauf que l'on substitue de l'ammoniaque à l'eau régale servant à dissoudre l'oxydule.

Dans un tube à hémolyse, on introduit 1 cc 6 de SO^4H^2 $\frac{N}{12}$, 0 cc 2 de sang prélevé par piqûre ; on agite pour mélanger et on ajoute 0 cc 2 de tungstate de sodium à 10 %. Après une nouvelle agitation et un contact de 5 minutes, on centrifuge.

On prélève 1 cc du liquide clair correspondant à 0 cc 1 du sang initial et on introduit dans un tube à hémolyse avec 1 cc de la liqueur cupro-tartrique-carbonatée de Fontes et Thivolle. Le tube à hémolyse est garni, à son ouverture, d'un tube de caoutchouc souple de 5 centimètres environ de longueur et l'on obture par une pince de Mohr. On le suspend ensuite pendant 30 minutes dans un bain-marie bouillant (au bout de 5 minutes d'ébullition, on chasse l'air des tubes en ouvrant la pince un instant). On le refroidit rapidement. A ce moment, l'oxydule de cuivre s'est aggloméré au fond du tube sous une forme très compacte, on détache le tube de caoutchouc.

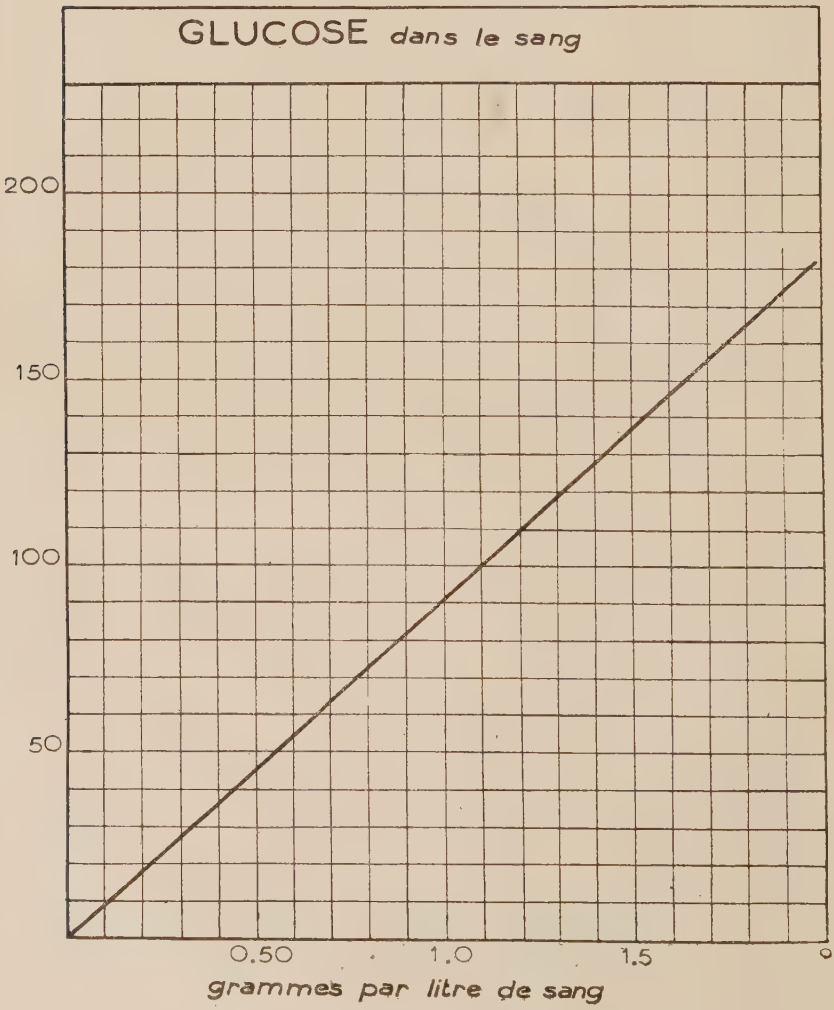
On centrifuge le dépôt surmonté par l'excès de réactif, pour le rendre très adhérent au fond du tube. On fait quatre lavages avec 2 cc d'eau distillée (récemment préparée dans un appareil en verre Pyrex). On centrifuge 2 minutes, chaque fois à bonne vitesse (4 à 5.000 tours par minute). On reprend le précipité d'oxydule par l'ammoniaque en agitant à l'air jusqu'à dissolution complète et on introduit dans une jauge de 25 cc. On rince encore à l'ammoniaque le tube à hémolyse, et on emploie au total au moins 10 cc de ce dernier réactif.

On utilise comme réactif colorant 10 cc de la solution de diethyldithio-carbamate de sodium dont nous avons indiqué plus haut la préparation ; on complète au trait. La solution colorée reste stable plusieurs heures.

On mesure alors la déviation correspondant à la variation de densité optique soit : N divisions, puis la déviation du témoin

caractérisant le phénomène d'hydrolyse du réactif, soit N' divisions. La différence N — N' est proportionnelle à la concentration du sang en glucose ; elle est donnée par le graphique ci-joint.

On voit l'intérêt d'un tel microdosage pour l'épreuve de l'hyperglycémie alimentaire qui, suivant la méthode de Marcel Labbé et Nepveux par exemple, nécessite des mesures du taux du sang en glucose de 30 en 30 minutes durant 3 ou 4 heures.



VII. — MICRODOSAGE DE L'UREE

Un microdosage de l'urée dans le sang est particulièrement désirable en raison de la grande fréquence avec laquelle ce dosage est pratiqué.

Il a déjà été décrit des méthodes plus ou moins commodes et plus ou moins exactes permettant ce microdosage.

Nous avons examiné la méthode de LEVINSON *(17)* à cause de sa grande commodité. Elle consiste essentiellement à opérer sur le sang déféqué à l'hydrate de zinc d'après la technique de HAGEDORN et JENSEN ; à soumettre le sang déféqué à l'action de l'hypobromite étendu en excès et, après avoir déterminé la quantité d'hypobromite en excès, à calculer l'urée correspondant à l'hypobromite disparu par oxydation.

LEVINSON *(17)* a indiqué que le dosage se pratique sur 0 cc 1 de sang en utilisant de l'hyposulfite N/100 pour le titrage de l'hypobromite en excès. Avec sa méthode il arrive à réaliser 10 à 15 déterminations à l'heure.

Dans ces analyses l'erreur moyenne ne dépasse pas, d'après l'auteur, 5 % lorsqu'on opère sur des solutions titrées d'urée chimiquement pure.

Si on effectue des déterminations sur des sangs d'urémiques et que l'on compare les chiffres obtenus à ceux que fournit une méthode exacte telle que le titrage à l'uréase avec distillation de l'ammoniaque formé, on obtient d'après LEVINSON *(17)* des résultats qui, pour le clinicien, restent satisfaisants : généralement la méthode à l'uréase fournit des chiffres un peu inférieurs à ceux de la méthode de LEVINSON.

GOLSES *(8)* a indiqué que le glucose et l'acétone du sang décomposant de l'hypobromite pouvaient fausser, dans des conditions sérieuses, le dosage de l'urée.

Nous avons vérifié en effet que dans les conditions opératoires de LEVINSON (employant pour plus d'exactitude un hyposulfite N/200 au lieu de N/100 préparé au moment du besoin, nous servant comme indicateur d'un bon empois d'amidon fait au 1/200) une concentration en glucose de l'ordre de 1 gr. par litre, fournit un chiffre apparent en urée de l'ordre de 0 gr. 16 par litre ; de même une concentration en acétone de l'ordre de 1 gr. par litre fournit une augmentation apparente équivalente à 1 gr. d'urée par litre.

En pratique, les acétonémies élevées (de l'ordre de 2 gr. par litre) ne se rencontrent guère que dans le cas de coma diabétique où le chiffre de l'urée présente une importance secondaire vis-à-vis du chiffre du glucose. Du reste l'erreur provoquée par l'acétone pourrait être évitée en éléminant celle-ci par évaporation.

Par contre, chez les diabétiques à jeun, on rencontre des glycémies atteignant 3 gr. par litre et il est alors nécessaire de tenir compte de cette perturbation. On peut, pour cela, doser le glucose par la méthode colorimétrique déjà décrite.

On peut avoir recours aussi, pour le dosage de l'urée, à la méthode plus laborieuse décrite par Mme B. POHORECKA-LELESZ *(19)* dont le principe est le suivant :

Le dosage est pratiqué sur 0 cc 1 de sang dont l'urée est transformée en ammoniaque par l'uréase. L'opération est faite dans un tube spécial à pH et à température convenables, et l'ammoniaque formé est entraîné par aspiration au vide d'une trompe à eau dans l'acide chlorhydrique où on le titre volumétriquement par Br O Na.

On distille à sec pour éviter toute perte d'ammoniaque.

Cette méthode est très élégante. Elle ne dose rigoureusement que l'urée et l'ammoniaque préformé du sang.

Au lieu de titrer l'urée par l'hypobromite dans la solution de chlorhydrate d'ammoniaque on pourrait vraisemblablement évaporer à sec, en évitant d'introduire de l'ammoniaque toujours présent dans l'atmosphère du laboratoire ; redissoudre le Am Cl formé et doser le chlorure par la méthode antérieurement décrite. Nous avons vérifié que la quantité de chlorure ainsi produite à partir de 0 cc 1 de sang, serait parfaitement dosable par cette méthode.

Comme autres microméthodes de dosage de l'urée sanguine, nous rappellerons encore celle de C. et S. Auguste *(1)* qui partent de 0 cc 1 de sérum et utilisent la précipitation au xanthydrol (méthode néphélométrique).

La microméthode pondérale de Nicloux qui opère sur 0 cc. 3 de sang, mais exige une microbalance.

La méthode de Hindmarsh et Priestley *(9)* pratiquant la transformation de l'urée en ammoniaque par l'uréase et le dosage colorimétrique de l'ammoniaque.

Celle de Rehberg *(20)* qui transforme l'urée en ammoniaque par l'uréase et dose acidimétriquement l'ammoniaque formé.

VIII. — CONCLUSION

Nous pensons avoir mis en évidence l'intérêt considérable que présente la cellule photoélectrique comme moyen de dosage des principaux constituants du sang, dont le biologiste et le clinicien doivent souvent interpréter les variations.

Les principales qualités des microdosages exposés résident :

— dans la faible prise d'essai nécessitée, facilement obtenue par piqûre du doigt au lit du malade et n'impressionnant pas celui-ci ;

— dans la répétition facile des prises de sang à quelques minutes d'intervalle sans nouvelle piqûre ;

— dans l'exécution facile, rapide et peu onéreuse des dosages, avec une sécurité et une précision largement suffisantes pour les besoins de la pratique médicale.

Il y a là un ensemble de qualités qui légitiment l'effort accompli et nous espérons bien que notre étude facilitera le travail des hôpitaux, des cliniques et des laboratoires où l'installation d'un colorimètre photoélectrique sera rapidement amortie par le haut rendement qu'on peut attendre d'un tel appareil.

IX. — BIBLIOGRAPHIE

1. Auguste C. et S. — *Bull. Soc. Ch. Biol.* 1925, p. 639.
2. P. Cristol. — Précis de chimie biologique médicale. *Masson - Paris* 1935.
3. Derrien et Fontes. — Chimie Biologique Médicale. *Baillière* 1931.
4. W.-L. Dulière et M. Adant. — *Bull. Soc. de Chimie Biologique,* novembre 1936, p. 1.589, Tome XVIII n° 1.
5. Durupt. — Microméthodes et semi-microméthodes appliquées aux analyses chimiques du sang et des humeurs. *Poinat - Paris* (2e éd.) 1930.
6. G. Etienne et M. Vérain. — *C.R. Soc. Biol.,* 23 février 1926. T. XCIV, p. 675. Dosage de certaines substances par densité optique.
7. P. Fleury. — Techniques de Chimie Biologique (Sang 4) *Véga - Paris* 1934 - 3 éd. (+ supplément 1935).
8. Golses. — *Bull. Soc. Chimie Biologique,* février 1925, T. VII, n° 2, p. 167.
9. Hindmarsh et Priestley. — *Bioch. Journal,* Vol. XVIII, n° 1, 1924, p. 252 et Vol. XIX, n° 2, Année 1925.
10. O. Kauner. — *C.R. Soc. Biol.,* 17 octobre 1931, p. 383
11. O. Kauner et M. Chancogne. — *C.R. Soc. Biol.,* 6 mai 1933 p. 57.
12. Ed. Lasausse et L. Frocrain. — Dosage iodométrique du fer dans le sang. *J. de Ph. et de Ch.,* 16 janvier 1936, p. 82. 8e série, T. XXIII.
13. Ed. Lasausse et L. Frocrain. — Dosage colorimétrique du cuivre. par la méthode de M. Delépine dans les produits

d'origine biologique. *J. Ph. et Ch.*. 16 janvier 1936, p. 77, 8e série, Tome XXIII.

14. Ed. LASAUSSE, R. KERMAREC, L. FROCRAIN. — Dosage du glucose dans le sang par colorimétrie du cuivre. *J. Ph. et Chimie,* 16 octobre 1936, p. 461, 8e série, T. XXIV.
15. P. LAURENT, GÉRARD. — Dosage colorimétrique en lumière monochromatique de la cholestérine, du glucose, de l'ac. urique et de l'hémoglobine. *C.R. Soc. Biol.,* 5 mai 1928, T. XCVIII, p. 1325.
16. LEGER et MARTIN. — Ce qu'il faut savoir de la méthode syphilimétrique Vernes et des applications du photomètre. *Paris-Maloine* 1929.
17. LEVINSON. — *Bull. Soc. Ch. Biol.* 1935, n° 7-8, p. 1.157.
18. MERCK. — « Medizinisch - Chemische Untersuchungsmethoden ». *IIe Edition française - Darmstadt* 1935.
19. B. POHORECKA-LELESZ. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, octobre-novembre 1925, Tome VII, n° 9, p. 1.085.
20. P.-B. REHBERG. — *Bioch. Journal,* Vol. XIX, n° 2 1925, p. 270-278.
21. SCHOENHEIM et SPIRAY. — *J. of. Biolog. Chemistry,* T. 106, p. 725 (1934).

VU :
Strasbourg, le 28 Juin 1937.
Le Président du Jury,
A. SARTORY.

VU ET APPROUVÉ :
Strasbourg, le 28 Juin 1937.
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
A. SARTORY.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Strasbourg, le 30 Juin 1937.
Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université,
J. DRESCH.

Table des Matières

AVANT-PROPOS. 13

PREMIÈRE PARTIE :

Utilisation de la cellule photoélectrique dans le séro-diagnostic de la syphilis.

I. Introduction 19
II. Description de l'appareil employé 27
III. Rappel de conceptions théoriques relatives à l'épreuve de B. W. 31
IV. Essais préliminaires. 37
V. Choix des méthodes analytiques de comparaison 49
VI. Etablissement de la méthode 61
VII. Montage de la méthode 81
VIII. Résultats de la méthode 85
IX. Etude critique de la méthode 95
X. Etude des constituants de la réaction 109
XI. Contribution à l'établissement d'un microséro-diagnostic de la syphilis. 133
XII. Conclusion 143
XIII. Bibliographie. 145

DEUXIÈME PARTIE :

Utilisation de la cellule photoélectrique dans le micro-dosage des principaux constituants chimiques du sang.

I. Introduction 157
II. Prise de sang 161
III. Microdosage des chlorures 163
IV. Microdosage de l'hémoglobine 167
V. Microdosage du cholestérol total 173
VI. Microdosage du glucose 179
VII. Microdosage de l'urée. 183
VIII. Conclusion. 187
IX. Bibliographie. 189